

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Gerly Pöder

**Mutsiinide ekspressiooni uurimine inimese trofoblasti- ja endomeetriumi
rakuliinides**

Magistritöö

Juhendajad
vanemteadur Erkki Juronen
dotsent Sulev Ingerpuu

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1. MUTSIINID	7
1.1.1. Mutsiin MUC1	9
1.1.2. Mutsiin MUC3.....	11
1.1.3. Mutsiin MUC4.....	11
1.1.4. Mutsiin MUC12.....	12
1.1.5. Mutsiin MUC13.....	12
1.1.6. Mutsiin MUC15.....	13
1.1.7. Mutsiin MUC17.....	14
1.2. PLATSENTA	14
1.2.1. Endomeetrium.....	15
1.2.2. Trofoblastid	17
1.2.3. Sarnasused trofoblastide ja vähirakkude vahel.....	20
2. EKSPERIMENTAALOSA	22
2.1. TÖÖ EESMÄRGID	22
2.2. MATERJAL JA METOODIKA	22
2.2.1. Kasutatud rakuliinid.....	22
2.2.2. Kasutatud antikehad.....	23
2.2.3. Rakkude lüüsimine.....	23
2.2.4. Valkude SDS-poliakrüülamiidgeel elektroforees ja Western blot analüüs	23
2.2.5. Immunofluorestsentsmikroskoopia	24
2.2.6. RNA eraldamine ja cDNA süntees.....	24
2.2.7. Kasutatud oligonukleotiidid	25

2.2.8. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	25
2.2.9. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR).....	26
2.2.10. Andmete statistiline analüüs	26
2.3. TULEMUSED.....	27
2.3.1. Uued mutsiinide vastased monoklonaalsed antikehad	27
2.3.2. Praimerite spetsiifilisus	28
2.3.3. MUC1 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides	29
2.3.4. MUC3 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides	30
2.3.5. MUC4 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides	32
2.3.6. MUC12 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides	32
2.3.7. MUC13 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides	33
2.3.8. MUC15 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides	33
2.3.9. MUC17 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides	35
2.4. ARUTELU	35
KOKKUVÕTE	39
SUMMARY	40
TÄNUAVALDUSED	42
KIRJANDUSE LOETELU	43
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	52
LISAD	53
LISA 1.....	53
LISA 2.....	54
LIHTLITSENTS.....	55

KASUTATUD LÜHENDID

ADAM17 – *a disintegrin and metalloproteinase 17*

AMOP – *adhesion associated domain in MUC4 and other proteins*

CTGF – *connective tissue growth factor*, sidekoe kasvufaktor

ECM – *extracellular matrix*, ekstratsellulaarne maatriks

EGF – *epidermal growth factor*, epidermaalne kasvufaktor

EGFR – *epidermal growth factor receptor*, epidermaalse kasvufaktori retseptor

EMT – *epithelial-mesenchymal transition*, epiteliaal-mesenhümaalne transitsioon

ER – *endoplasmic reticulum*, endoplasmaatiline retiikulum

EVT – ekstravilloosne trofoblast

FAK – *focal adhesion kinase*, fokaalne adhesioonikinaas

GAPDH – *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, glütseeraldehüüd 3-fosfaat dehüdrogenaas

Grb2 – *growth factor receptor-bound protein 2*, kasvufaktori retseptoritega seostuv valk 2

HBEGF – *heparin-binding EGF-like growth factor*, hepariini siduv EGF-sarnane kasvufaktor

hCG – *human chorionic gonadotropin*, inimese koorioni gonadotropiin

HER2 – *human epidermal growth factor receptor 2*, inimese epidermaalse kasvufaktori retseptor 2

HIF-1 α – *hypoxia-inducible factor 1- α* , hüpopksia poolt indutseeritav faktor α

ICAM1 – *intercellular adhesion molecule-1*, rakkudevaheline adhesioonimolekul 1

ICM – *inner cell mass*, sisemine rakumass

IGF-1 – *insulin-like growth factor 1*, insuliini-sarnane kasvufaktor 1

IL-6 – *interleukin 6*, interleukiin 6

LIF – *leukemia inhibitory factor*, leukeemia inhibitoorne faktor

MAK – monoklonaalne antikeha

MAPK – *mitogen-activated protein kinase*, mitogeenselt aktiveeritav valgukinaas

MHC I – *major histocompatibility complex I*, põhiline koesobivuskompleks I

MMP – *matrix metalloproteinase*, maatriksi metalloproteinaas

MUC – *mucin*, mutsiin

NF- κ B – *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NIDO – *nidogen like domain*, nidogeni sarnane domeen

PAK – polükloonaalne antikeha

PAK1 – *p21 activated kinase 1*, p21 aktiveeritav kinaas 1

PDGF – *platelet derived growth factor*, vereliistakute kasvufaktor

PI3K – *phosphatidylinositol-3 kinase*, fosfatidüülinositol-3 kinaas

PTS domeen – proliini-, seriini- ja treoniini-rikas domeen

SEA – *sea urchin sperm protein, enterokinase, and agrin*

SH2 domeen – *Src homology 2 domain*

ST – süntsüütiotrofoblast

STAT3 – *signal transducer and activator of transcription 3*, signaali ülekandja ja transkriptsioonifaktor 3

TGF- β – *transforming growth factor β* , transformeeriv kasvufaktor β

TIMP-1 – *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*, kudede metalloproteinaaside inhibiitor 1

TNF- α – *tumor necrosis factor α* , tuumori nekroosi faktor α

VEGF-A – *vascular endothelial growth factor A*, vaskulaarne endoteeli kasvufaktor A

Wnt – *wingless integration 1*

vWF – *von Willebrand factor*, von Willebrandi faktor

SISSEJUHATUS

Imetajatel on loote üsasise arengu toetamiseks kujunenud välja platsenta, mille vahendusel toimub lootele toitainete- ja hapniku transport, jääkainete eemaldamine ning loote kaitsmine ema immuunsüsteemi eest. Platsenta areng algab implantatsiooniga, mil lootepoolsed trofoblasti rakud kinnituvad emapoolsetele endomeetriumi rakkudele. Sellele järgneb trofoblastide tungimine ema kudedesse ning endomeetriumi ulatuslik ümberkujundamine, et tagada loote arenguks piisav toitainete ja hapniku juurdevool.

Implantatsiooni ebaõnnestumise tõttu lõppeb üksnes kolmandik kunstliku viljastamise korral toimuvatest embrüo ülekannetest elussünniga. Nii trofoblastide liigne kui vähene invasioon võib põhjustada kõrvalekaldeid platsenta normaalsest arengust. Häired implantatsiooni toimumises ja platsenta varajases arengus võivad kaasa tuua loote kasvupeetuse, pre-eklampsia ning enneaegse- või nurisünnituse. Teadmised inimese platsenta arengust on puudulikud eelkõige eetilistel põhjustel. Platsenta kui organi tähtsusest annab tunnistust ka hiljuti USA Rahvusliku Tervise Instituudi poolt käivitatud üle 40 miljoni dollari suurune Inimese Platsenta Projekt. Platsenta bioloogia paremaks mõistmiseks on oluline uurida nii endomeetriumi retseptiivsust määravaid faktoreid kui ka trofoblastide diferentseerumise ja invasiooni mehhanisme.

Mutsiinid on epiteelirakkudes ekspresseeruvad valgud, millede funktsioone on uuritud eelkõige seoses kasvajate arenguga. Vähem on uuritud nende seost viljatuse, implantatsiooni toimumise ja platsenta moodustumisega. Mitmed teadustööd on näitanud mutsiinide osalust signaaliradades, mida kasutavad oma arengus nii vähirakud kui ka trofoblastid.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli iseloomustada uusi transmembraansete mutsiinide vastu saadud monoklonaalseid antikehasid ning uurida transmembraansete mutsiinide ekspressiooni erinevates inimese trofoblasti ja endomeetriumi rakuliinides.

Töö on valminud TÜ arstiteaduskonna biomeditsiini instituudi inimese bioloogia ja geneetika ja TÜMRI rakubioloogia õppetoolis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Mutsiinid

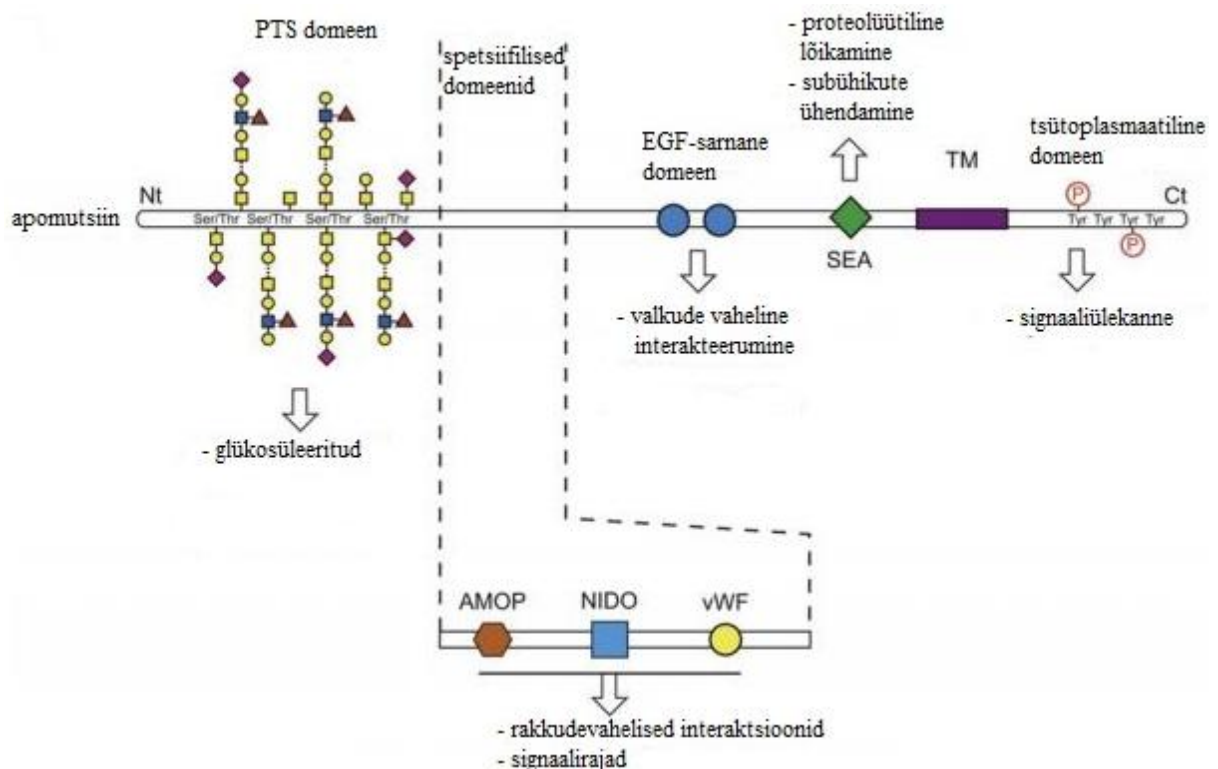
Mutsiinid (ingl *mucin*, MUC) on suured (100-1000 kDa) glükosüleeritud valgud, millede põhifunktsiooniks on organite valendikke ja juhasid katvate epiteelirakkude kaitsmine välisärritajate eest. Lisaks on näidatud nende osalust epiteelirakkude uuenemise, diferentseerumise, rakkudevahelise suhtlemise ja adhesiooni reguleerimises. Üks olulisimaid põhjuseid mutsiinide bioloogia uurimiseks on nende seotus kasvajate arenguga (Andrianifahanana jt, 2006).

Mutsiinide valgulist osa nimetatakse apomutsiiniks. See on pikk peptiidahel, millega seotakse sadu polüsahhariidjääke. Mutsiinid jagatakse nende struktuuri alusel kahte põhirühma: sekreteeritavateks (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC19) ja membraanseoselisteks (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20, MUC21, MUC22) (Jonckheere jt, 2013). Sekreteeritavad mutsiinid tekkisid loomariigi varajases evolutsioonis ning membraanseoselised mutsiinid tekkisid selgroogsete loomade tulekuga, kusjuures enamuse (v.a. MUC4 ja MUC16) esinevad ainult imetajatel (Duraismy jt, 2006; Lang jt, 2007).

Sekreteeritavad mutsiinid moodustavad endoplasmaatilises retiikulumis (ingl *endoplasmic reticulum*, ER) dimeere, millele lisatakse Golgi kompleksis O-seoselised suhkrujäägid. Seal toimub ka nende valkude pakkimine vesiikulitesse, et neid seejärel rakuvälisesse ruumi transportida. Sekreteeritavad mutsiinid osalevad epiteelirakke katva lima moodustamises (Corfield, 2015).

Membraanseoselised mutsiinid sünteesitakse ühe peptiidahelana, mille proteolüütilisel lõikamisel saadakse funktsionaalne kahest subühikust koosnev valk. ER-s lisatakse valgule N-seoselised suhkrujäägid ning Golgi kompleksis O-seoselised suhkrujäägid. Viimaks jõuavad valgud raku välismembraanile (Corfield, 2015). Tüüpilisel membraanseoselisel mutsiinil esineb rakuväline tandeemsete kordustega proliini-, seriini- ja treoniini-rikas domeen (PTS domeen), epidermaalse kasvufaktori sarnane domeen (ingl *epidermal growth factor*, EGF), SEA (ingl *sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin*) domeen, transmembraanne domeen ja tsütoplasmaatiline domeen (Joonis 1). PTS domeen on mitmete koespetsiifiliselt ekspresseeruvate glükosüül- ja sulfotransferaaside sihtmärgiks. Suhkrujäägid võivad moodustada üle poole funktsionaalse mutsiini molekulmassist ning mitmete haiguste

korral võivad toimuda muutused mutsiinide glükosüleerimise mustris. PTS domeen toimib rakuvälise sensorina ning interakteerub viiruste, bakterite, immuunrakkude ja antikehadega. EGF-sarnane domeen võib toimida teistele membraanretseptoritele ligandina, aga ka kasvufaktorina ning osaleda raku apoptoosi ja migratsiooni mõjutavates signaaliradades. Mutsiinide rakuvälises osas paikneb tavaliselt üks SEA domeen, kus toimub valgu proteolüütiline lõikamine kaheks subühikuks. Membraanseoseliste mutsiinide tsütoplasmaatilised domeenid on erinevate kinaaside sihtmärgiks ja osalevad mitmetes signaaliradades (Jonckheere jt, 2013).



Joonis 1. Membraanseoseliste mutsiinide struktuur. Membraanseoselistel mutsiinidel esineb tsütoplasmaatiline domeen, mis võib osaleda signaaliülekanndes, sellele järgneb transmembraanne domeen (TM) ning valgu rakuvälises osas paikneb SEA domeen, EGF-sarnane domeen ja glükosüleeritud PTS domeen. Lisaks võivad mõnedel mutsiinidel esineda ka AMOP (ingl *k adhesion associated domain in MUC4 and other proteins*), nidogeni sarnane domeen (ingl *nidogen like*, NIDO) ja von Willebrandi faktori domeen (ingl *von Willebrand factor*, vWF). Modifitseeritud joonis (Jonckheere jt, 2013).

1.1.1. Mutsiin MUC1

MUC1 geen paikneb 1. kromosoomi pikas õlas ja koosneb 7 eksonist. MUC1 valk on 120-500 kDa suurune ning selle suurus sõltub alternatiivsest splaissimisest, tandeemsete korduste arvust ja glükosüleerimisest (Gendler, 2001). Mitmed rakusisesed kinaasid võivad MUC1 tsütoplasmaatilist domeeni fosforüleerida. Tsütoplasmaatilise domeeniga võivad seonduda ka transkriptsioonifaktorid, millega koos võib MUC1 reguleerida üles erinevate sihtmärkgeenide transkriptsiooni. Seonduvatest transkriptsioonifaktoritest võib esile tuua signaali ülekandja ja transkriptsioonifaktor 3 (ingl *signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3), NF- κ B (ingl *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), p53 ja β -kateniini (Nath ja Mukherjee, 2014).

MUC1 ekspresseerub piimanäärmes, naiste suguteedes, kopsus, neerus, maos, sapipõies, pankreases, platsentas ning hematopoieetilistes rakkudes (Brayman jt, 2004; Gendler, 2001; Shyu jt, 2007). MUC1 ekspressioon on tõusnud paljudes adenokartsinoomides, kuid ka T- ja B-rakulistes lümfoomides ja müeloomides (Gendler, 2001).

MUC1 ekspressiooni kontrollitakse enamasti transkriptsiooni või geenidoosi tasemel, kuid on kirjeldatud ka post-transkriptsioonilist mõjutamist miRNAdega. *MUC1* ekspressiooni taset tõstavad interleukiin 6 (ingl *interleukin 6*, IL-6), interferoonid, prolaktiin, steroidhormoonid ja hüpopksia poolt indutseeritav faktor α (*hypoxia-inducible factor 1- α* , HIF-1 α). Lisaks epiteelispetsiifilistele *cis*-elementidele sisaldab *MUC1* promooter ka T-raku spetsiifilisi *cis*-elemente (Gendler, 2001; Nath ja Mukherjee, 2014).

Endomeetriumi pinnal paiknev MUC1 on oluline molekul blastotsüsti implanteerumisel. *MUC1* ekspressioon on progesterooni toimel kõrgeim retseptiivses endomeetriumis, tõuseb veelgi blastotsüsti olemasolul apositsiooni faasis, kuid adhesiooni faasis eemaldatakse lokaalselt vastusena blastotsüstilt tulevatele parakriinsetele signaalidele (Meseguer jt, 2001). Tuumori nekroosi faktor α (ingl *tumor necrosis factor α* , TNF- α) stimuleerib inimese endomeetriumi rakuliinis MUC1 ekspressiooni ja proteolüütilist eemaldamist ADAM17 (ingl *a disintegrin and metalloproteinase 17*) abil (Thathiah jt, 2003; Thathiah jt, 2004). Lisaks võib MUC1 rakkude pinnalt eemaldada maatriksi metalloproteinaas 14 (ingl *matrix metalloproteinase*, MMP) (Thathiah ja Carson, 2004). Muutused endomeetriumis ekspresseeruva MUC1 glükosüleerimise mustris (Horne jt, 2005), alleeli pikkuses (Horne jt, 2001) või ekspressiooni tasemes (Shen jt, 2015; Xu jt, 2012) võivad olla naiste vähenenud viljakuse põhjuseks.

Endomeetriumi ja trofoblasti rakkude pinnal ekspresseeruvad Thomsen–Friedenreichi antigeeniga MUC1 ning selle ligand galektiin 1 võivad olla embrüo kinnitumisel adhesioonimolekulideks (Bojic-Trbojevic jt, 2014; Jeschke jt, 2009). Makaagi trofoblastide pinnal ekspresseeruv MUC1 osaleb trofoblastide kinnitumisel ja tungimisel läbi emaka veresoonte endoteeli rakkude (Thirkill jt, 2007). Lisaks on kasvajalistes rakuliinides näidatud MUC1 seondumist endoteelis ekspresseeruva rakkudevahelise adhesioonimolekul 1 (ingl *intercellular adhesion molecule-1*, ICAM1), E-selektiini (Geng jt, 2012) ja galektiin-3-ga (Yu jt, 2007). MUC1 võib trofoblastide ja endomeetriumi vahel toimida ka anti-adhesiivselt (Chervenak ja Illsley, 2000).

MUC1-l on oluline roll ka platsenta arengus. *MUC1* ekspressioon tõuseb platsentas kogu raseduse jooksul ning ekspresseerub põhiliselt süntsüütiotrofoblastides (ST) (Shyu jt, 2008). *MUC1* ekspressioon tõuseb preeklampsia korral ST-s ja ekstravilloossetes trofoblastides (EVT) ning see takistab raku ja ekstratsellulaarse matriksi (ingl *extracellular matrix*, ECM) vaheliste seoste teket ning EVT invasiooni, vähendades β 1-integriini aktiivsust ja fokaalse adhesioonikinaasi (ingl *focal adhesion kinase*, FAK) fosforüleerimist (Shyu jt, 2011). *MUC1* üleekspressioon võib trofoblasti-sarnaste rakkude invasiivsust inhibeerida ka läbi MMP9 aktiivsuse vähendamise (Shyu jt, 2008).

Eelkõige on MUC1 funktsiooni uuritud siiski kasvajate bioloogia seisukohalt. Kasvajalistes rakuliinides on näidatud MUC1 toimet rakkude invasiivsuse, migratsiooni, proliferatsiooni ja elulemuse soodustajana. MUC1 mõjutab epiteliaal-mesenhümaalse transitsiooni (ingl *epithelial-mesenchymal transition*, EMT) toimumist ja sellega seotud rakkude suurenenud invasiivsust läbi Wnt/ β -kateniini (ingl *wingless integration 1*) signaaliraja ja miRNAde ekspressiooni mõjutamise (Nath ja Mukherjee, 2014). MUC1 võib rakkude invasiivsust ja migreerumist soodustada ka läbi integriinide ja ECM vaheliste interaktsioonide mõjutamise (Kumar jt, 2014; Nath ja Mukherjee, 2014). Seostudes epidermaalse kasvufaktori retseptoriga (ingl *epidermal growth factor receptor*, EGFR) soodustab MUC1 G1/S faasi geeniekspressiooni. Lisaks soodustab MUC1 sidekoe kasvufaktori (ingl *connective tissue growth factor*, CTGF), vaskulaarse endoteeli kasvufaktori A (ingl *vascular endothelial growth factor A*, VEGF-A) ja vereliistakute kasvufaktori (ingl *platelet derived growth factor*, PDGF) tootmist, mis omakorda aktiveerivad mitogeenselt aktiveeritavate valgukinaaside (ingl *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) ja fosfatidüülinositol-3 kinaas/Akt (ingl *phosphatidylinositol-3 kinase*, PI3K) signaaliradasid aidates kaasa vähirakkude prolifereerumisele, elulemusele ning angiogeneesile (Nath ja Mukherjee, 2014).

1.1.2. Mutsiin MUC3

MUC3 geen paikneb 7. kromosoomi pikas õlas (Williams jt, 1999b) ja koosneb 11 eksonist (Crawley jt, 1999). *MUC3* geen on inimese genoomis duplitseerunud, esinedes *MUC3A* ja *MUC3B* variandina. Valgu tasemel erinevad need mõne aminohappe poolest (Pratt jt, 2000).

MUC3 ekspresseerub platsentas, peensooles, käärsooles, sapipõies ja neerus. Geeni ekspressioon väheneb käärsoolekasvajates, kuid tõuseb neerukasvajates ja maokasvajates (Crawley jt, 1999; Leroy jt, 2002; Shyu jt, 2007; Wang ja Fang, 2003).

MUC3 ekspressioon tõuseb rinnanäärme- ja rakuliinis steroidhormoonide (östradiol, testosteroon, progesteron, kortisool) toimel (de Bolos jt, 1998). Sooleepiteeli rakuliinis seondub HIF- α hüpoksia tingimustes *MUC3* promooterile ning tõstab selle ekspressiooni (Louis jt, 2006).

1.1.3. Mutsiin MUC4

MUC4 geen paikneb 3. kromosoomi pikas õlas ja koosneb 26 eksonist. *MUC4* valk võib olla 550-930 kDa suurune ning selle tsütoplasmaatilises domeenis esinevad potentsiaalsed fosforüleerimissaidid. Lisaks tavapärastele mutsiinidele omastele domeenidele esinevad *MUC4*-l veel NIDO ja AMOP domeenid, mis osalevad rakk-rakk ja rakk-ekstratsellulaarne maatriks vahelistes interaktsioonides ning vWD domeen, mis osaleb signaaliradades (Chaturvedi jt, 2008a; Senapati jt, 2012). EGF domeeni kaudu võib *MUC4* seonduda inimese epidermaalse kasvufaktori retseptor 2-ga (ingl *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) (Jonckheere jt, 2012).

MUC4 ekspresseerub naiste suguteedes, rinnanäärmes, trahheas ja süljenäärmetes (Chaturvedi jt, 2008a). *MUC4* ekspressioon võib erinevates kasvujärgkondades sõltuvalt koest ja kasvaja tüübist olla kas vähenenud või suurenenud (Chaturvedi jt, 2008a). *MUC4* vWD domeenis tekkinud polümorfismid võivad naistel põhjustada endometrioosi ning sellega kaasnevat viljatust (Chang jt, 2011).

Erinevates kasvujärgkondades ekspresseeruv *MUC4* võib läbi interaktsioonide erinevate EGFR perekonna valkudega aktiveerida FAK, Akt ja ERK signaaliradasid ning sellega suurendada rakkude liikuvust, invasiivsust ja proliferatsiooni (Chaturvedi jt, 2008b; Li jt, 2014; Mukhopadhyay jt, 2013; Ponnusamy jt, 2008; Singh jt, 2004). *MUC4* suurendab rakkude invasiivsust ja liikuvust ka läbi aktiini tsütoskeleti ümberkorralduste ning takistades rakkude interakteerumist ECM komponentidega (laminiin, kollageen IV, kollageen I,

fibronektiin) (Chaturvedi jt, 2007; Rachagani jt, 2012). Aktiveerides Wnt/ β -kateniini signaalirada, suurendab MUC4 rakkude proliferatsiooni ja angiogeneesi (Zhi jt, 2014). Pankreasekasvaja rakuliini pinnal oleva MUC4 suhkrujäägid interakteeruvad endoteelirakkude pinnal oleva galektiin-3-ga. Vastuseks nende omavahelisele seondumisele muudetakse MUC4 paiknemist raku pinnal ja see võib nähtavale tuua varem varjus olnud adhesioonivalgud ning aidata kaasa kasvajarakkude ja endoteelirakkude vahelisele adhesioonile (Senapati jt, 2011).

1.1.4. Mutsiin MUC12

MUC12 geen paikneb 7. kromosoomi pikas õlas. *MUC12* geen ekspresseerub kõige rohkem käärsooles, vähemal määral ka pankreases, eesnäärmes ja emakas. Käärsoolekasvajate korral on ekspressioon vähenenud või puudub (Williams jt, 1999a).

MUC12 bioloogilisi funktsioone pole uuritud. On tõstatatud üks hüpotees, mille kohaselt *MUC12* ekspressiooni vähenemine või kadumine käärsoolekasvajates võiks põhjustada rakkudevaheliste külgliiduste nõrgenemist ja sellega soodustada rakkude migratsiooni ja invasiooni (Matsuyama jt, 2010).

1.1.5. Mutsiin MUC13

MUC13 geen paikneb 3. kromosoomi pikas õlas. MUC13 valk on umbes 54 kDa suurune ning selle tsütoplasmaatilises domeenis on mitmeid potentsiaalseid fosforüleeritavaid seriini- ja treoniinjääke, mis võimaldavad valgul osaleda erinevates signaaliradades (Williams jt, 2001).

MUC13 ekspresseerub tugevalt jämesooles ja trahheas, vähemal määral ka neerus, peensooles, pimesooles ja maos ning madalal tasemel pankreases, eesnäärmes, emakas, kopsus, maksas, neerupealises, põrnas, leukotsüütides, lümfisõlmes, luuüdis, testises ja munasarjas (Shyu jt, 2007; Williams jt, 2001). *MUC13* ekspressioon on suurenenud munasarja- (Chauhan jt, 2009), käärsoole- (Walsh jt, 2007) ja pankreasekasvajate (Chauhan jt, 2012) korral.

Munasarjakasvaja rakuliinis tõstab MUC13 *HER2*, p21 aktiveeritava kinaasi 1 (ingl *p21 activated kinase 1*, PAK1) ja *p38* ekspressiooni, mille abil toimuvad ümberkorraldused aktiini-tsütoskeletis ning sellega suureneb rakkude liikuvus. MUC13 soodustab rakkude proliferatsiooni p38 MAPK signaaliraja kaudu. (Chauhan jt, 2009). *MUC13* üleekspressioon käärsoolekasvaja rakuliinis suurendab rakkude prolifererumist, migreerumist ja invasiivsust,

kuna tõuseb paljude vähi arengut soodustavate geenide ekspressioon (nt *IL8*, *MMP1*, fibroblasti kasvifaktori retseptor 2, *PDGFB*), väheneb *p53* ekspressioon ning aktiveeritakse HER2-ERK signaalirada (Gupta jt, 2014). *MUC13* üleekspressioon pankreasekasvaja rakuliinis suurendab läbi PI3K/Akt/MAPK raja aktiveerimise rakkude liikuvust, invasiivsust, proliferatsiooni ning vähendab rakkudevahelist ja raku-ECM-i vahelist adhesiooni (Chauhan jt, 2012).

1.1.6. Mutsiin MUC15

MUC15 geen paikneb 11. kromosoomi lühikeses õlas ja koosneb 5 eksonist. MUC15 valk on umbes 34 kDa suurune (Pallesen jt, 2002), kuid alternatiivse splaissingu tulemusena võib tekkida ka lühem sekreteeritud vorm, millel puudub transmembraanne domeen. MUC15 tsütoplasmaatilises domeenis on leitud motiive, mis võimaldavad sellel valgul osaleda signaaliradades. Näiteks PDZ domeeni siduv motiiv, EGFR fosforüleerimissait ja kasvufaktori retseptoritega seostuva valgu 2 (ingl *growth factor receptor-bound protein 2*, Grb2) SH2 domeeni (ingl *Src homology 2 domain*) siduv piirkond, mis viitavad võimalikule osalusele Ras signaalirajas (Pallesen jt, 2008).

MUC15 ekspresseeritakse põrnas, tüümuses, eesnäärmes, testises, munasarjas, peensooles, käärsooles, leukotsüütides, luuüdis, lümfisõlmes, kopsus, platsentas, pankreases, neerus, süljenäärmes, kilpnäärmes, trahheas, söögitorus, kiirusagaras, piimanäärmes (Pallesen jt, 2002; Pallesen jt, 2008; Shyu jt, 2007). *MUC15* ekspressioon on vähenenud maksavähi korral ning sellega kaasneb kasvaja suurenenud metastaseerumisvõime ning patsiendi lühem elulemus (Wang jt, 2013). Samas käärsoolekasvajates on *MUC15* ekspressioon suurenenud ning sellega kaasneb rakkude proliferatsioon, raku-ECM-i vaheline adhesioon ja suurenenud invasiivsus (Huang jt, 2009).

MUC15 võib mõjuda nii rakkude invasiivsust soodustavalt kui pärssivalt. MUC15 poolse ERK-MAPK signaaliraja aktiveerimisega soodustatakse rakkude adhesiooni kollageen IV, fibronektiinile ja laminiinile ning suureneb rakkude invasiivsus (Huang jt, 2009). EGFR-PI3K-AKT signaaliraja ning sellest allavoolu jäävate MMP2 ja MMP7 ekspressiooni inhibeerimisega võib MUC15 vähendada rakkude liikuvust, invasiivseid omadusi ning adhesioonivõimet ECM-le (Wang jt, 2013).

Võrreldes teiste mutsiinidega on MUC15 osalust platsenta arengus põhjalikumalt uuritud. MUC15 mRNA ja valgu tase tõuseb platsenta arengu jooksul. Esimese trimestri platsentas

ekspresseerub *MUC15* ST-des ja tsütotrofoblastides, kuid teisel ja kolmandal trimestril ekspresseerub see ainult ST-des. *MUC15* ekspresseerub ka detsiidua näärmerakkudes. *MUC15* üleekspressioon vähendab trofoblastisarnaste rakkude invasiivsust takistades MMP-9 ja MMP-2 toimimist, kuna tõuseb nende inhibiitorite kudede metalloproteinaaside inhibiitor 1 (ingl *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*, TIMP-1) ja TIMP-2 ekspressioon (Shyu jt, 2007).

1.1.7. Mutsiin MUC17

MUC17 geen paikneb 7. kromosoomi pikas õlas (Gum jt, 2002) ning see koosneb 13 eksonist (Moniaux jt, 2006). Alternatiivse splaissingu tulemusel tekib 2 erinevat MUC17 valku, millest üks jääb plasmamembraaniga seotuks, kuid teine on sekreteeritav. Täispikk MUC17 valk on umbes 500 kDa suurune (Moniaux jt, 2006).

MUC17 geeni ekspressioon on kõige kõrgem soole epiteelis (Gum jt, 2002; Senapati jt, 2010) ja pankrease adenokartsinoomis (Gum jt, 2002; Moniaux jt, 2006), kuid ta ekspresseerub vähesel määral ka platsentas (Shyu jt, 2007). Põletikulises käärsooles ja käärsoolekasvajates on *MUC17* ekspressioon vähenenud (Senapati jt, 2010).

MUC17 valgu tsütoplasmaatilises domeenis olevad seriini ja türosiini jäägid on potentsiaalsed fosforüleerimise sihtmärgid (Gum jt, 2002). Hüpkas tingimustes tõuseb *MUC17* ekspressiooni tase HIF1 α vahendatud mehhanismi kaudu (Kitamoto jt, 2012). MUC17 soodustab käärsoolekasvaja rakuliinides ERK signaaliraja kaudu adhesiooni ja migratsiooni ning vähendab rakkude apoptoosi (Luu jt, 2010).

1.2. Platsenta

Erinevalt teistest amniootidest on imetajad kohastunud embrüonaalseks arenguks ema organismis. Selle eripära tõttu on neil välja kujunenud emakas ning platsenta. Platsenta on ajutine organ, mis moodustub loote poolselt välimise lootekesta (koorioni) hattude kogumikest ja emapoolselt emaka limaskestast (endomeetriumi) muutunud väliskihist (detsiiduast) (Hussar jt, 2005). Inimese platsenta on kettakujuline ning küpses platsentas on umbes 30-40 koorionihattu, mida ümbritsevad trofoblasti rakud puutuvad kokku ema verega.

Platsenta on ajutine organ, mis täidab embrüonaalses arengus teiste, veel väljakujunemata organite (kopsud, maks, soolestik, neerud, endokriinnäärmed) ülesandeid. Platsenta üheks põhiliseks funktsiooniks on varustada loodet hapniku ja toitainetega. Toitained ja gaasid

võivad platsentasse liikuda difusiooni teel, transportvalkude vahendusel või endotsütoosiga. Platsenta on tähtis endokriinorgan, mille poolt eritavad hormoonid (näiteks progesteron, platsenta laktogeen ja platsenta kasvuhormoon) muudavad oluliselt ema füsioloogiat ja käitumist. Raseduse alguses suureneb toidu tarbimine ning energia talletamine, seevastu raseduse lõpukuudel on soodustatud selle energia vabastamine toetamaks loote kasvu ja valmistamaks ema ette laktatsiooniks. Selleks, et areneva loote ni jõuaks piisavas koguses toitaineid, tuleb platsenta moodustumisel kujundada ümber emaka spiraalarterid. Artereid ümbritsevad silelihasrakud kaovad kas dediferentseerumise või apoptoosi tulemusel ning arterite diameeter suureneb mitmekordselt. Lisaks toimub 9 kuu jooksul platsentas ulatuslik vaskulogenees ja angiogenees. Selleks, et loode saaks kasvada ja areneda sõltumata ema steroid- ja stressihormoonide ning saasteainete tasemest, tuleb platsental täita maksarakkude funktsiooni ning kahjutustada ksenobiootikume (Burton ja Fowden, 2015). Platsenta kaitseb loodet (ja vastsündinut) ka infektsioonide eest transportides emalt pärit IgG antikehi ning mõjutab ema immuunsüsteemi nii, et see ei satuks konflikti isa antigeenidega, mida kannavad ema kudede otseses kokkupuutes olevad trofoblasti rakud (Kumpel ja Manoussaka, 2012).

Platsenta areng algab implantatsiooniga, mis jagatakse kolme staadiumisse: apositsioon (pöörduv seondumine), adhesioon (pöördumatu seondumine) ja invasioon (tungimine läbi endomeetriumi epiteeli). Implantatsiooni edukaks toimumiseks vajatakse retseptiivset endomeetriumi, blastotsüsti arengujärgus olevat funktsioneerivat embrüot ning tihedat kahepoolset suhtlust ema ja embrüo kudede vahel (Achache ja Revel, 2006).

1.2.1. Endomeetrium

Endomeetrium on mitmekihiline ja dünaamiline kude emaka müomeetriumi pinnal, mis koosneb basaalkihist ja funktsionaalkihist. Igal kuul eemaldatakse funktsionaalkihi rakud menstruatsiooni käigus. Alles jäävad basaalkihi rakud, mis võimaldavad endomeetriumi taastuda. Endomeetrium koosneb mitmetest erinevatest rakutüüpidest: lumenit katab ühekihiline silinderepiteel, selle all asub sidekoeline strooma, milles paiknevad näärmeepiteeli rakud, fibroblastid, immuunrakud ning veresooned. Kõikide nende erinevate rakutüüpide hulk, aktiivsus, funktsioon ja struktuur muutuvad nii menstruaaltsükli kui raseduse käigus (Diedrich jt, 2007).

Naiste menstruaaltsükkel jagatakse nelja faasi. Esimeses faasis (1.-4. päev, menstruatsioonifaas) eemaldatakse endomeetriumi funktsionaalne kiht ning alles jääb õhuke

basaalkiht koos sidekoelise stroomaga ja näärmete lõpposadega. Teises faasis (5.-13. päev, proliferatsioonifaas) stimuleerib östrogeen endomeetriumi funktsionaalse kihi taastumist, kuid näärmed on veel kitsad ja inaktiivsed. Kolmandas faasis (alates 14. päev, sekretsioonifaas) munarakk väljub ovaariumist munajuhasse ning kollaskeha poolt toodetud progesteroon valmistab emakat raseduseks. Sekretsioonifaasis endomeetrium pakseneb, emakanäärmed omandavad sekretsioonivõime ning uteriinstrooma muutub kohevaks (detsidualiseerumine) (Hussar jt, 2005). Blastotsüst saab endomeetriumi kinnituda umbes nädal pärast viljastumist, menstruaaltsükli 20.-24. päeval ning seda perioodi nimetatakse implantatsiooniaknaks (Achache ja Revel, 2006). Kui viljastumist ei toimu, siis kollaskeha taandareneb ning progesterooni tootmine lakkab, mis indutseerib neljanda faasi (isheemiline faas) toimumise. Selles faasis toimub veresoonte kokkutõmbumise ja katkemise tulemusel kudede isheemia ja nekroos, mis võimaldab eemaldada endomeetriumi funktsionaalse kihi (Hussar jt, 2005).

Inimesel toimub endomeetriumi strooma rakkude spontaanne detsidualiseerumine umbes 6 päeva enne potentsiaalset implantatsiooni, et valmistada endomeetrium ette võimalikuks raseduseks. Detsidualiseerumise käigus endomeetriumis olevad fibroblasti-sarnased stroomarakud suurenevad ja muutuvad sekretoorseteks rakkudeks. Lisaks kujundatakse ümber emaka veresoonestik ning ekstratsellulaarne maatriks ja suureneb teatud immuunrakkude populatsioon (makrofaagid, emaka loomulikud tappurakud). Detsidualiseerumine on oluline implantatsiooni toimumiseks, kuid ka raseduse edasiseks edukaks kulgemiseks, sest see võimaldab areneval lootel ligipääsu ema verevarustusele (James jt, 2012). Detsidualiseerunud endomeetriumi strooma rakud on võimelised eristama arenguhäiretega blastotsüste normaalsetest blastotsüstidest ning vastavalt sellele kas inhibeerima või aktiveerima implantatsioonifaktoreid (Brosens jt, 2014; Teklenburg jt, 2010).

Emaka epiteelirakud on ema ja areneva blastotsüsti vahelise esmase kontakti vahendajad. Retseptiivses endomeetriumis tekivad emaka epiteelirakkude plasmamembraanist väljasopistused – pinopoodid. Lisaks toimuvad muutused rakkudevahelistes liidustes ning basaalmembraan pakseneb (Murphy, 2004). Selleks, et endomeetrium muutuks blastotsüstile vastuvõtlikuks, peavad sellel ekspresseeruma kindlad adhesioonimolekulid (integrinid, L-selektiin, E-kaderiin, ICAM-1) ning samal ajal peavad olema alla surutud embrüo kinnitumist inhibeerivad molekulid (MUC1). Retseptiivses endomeetriumis on üles reguleeritud ka mitmete tsütokiinide ekspressioon. Tsütokiinidest võib esile tuua leukeemia inhibitoorse faktori (ingl *leukemia inhibitory factor*, LIF), IL-6 ja IL-1. Endomeetriumi

vastuvõtlikkust ei mõjuta ainult tsüklilised hormoonide taseme kõikumised, vaid ka blastotsüstilt tulevad signaalid (Achache ja Revel, 2006). Juba enne implanteerumist mõjutab endomeetriumi epiteeli tsütokiinide sekretsiooni trofektodermi rakkude poolt sekreteeritav inimese koorioni gonadotropiin (ingl *human chorionic gonadotropin*, hCG) (James jt, 2012).

Blastotsüsti tungimisel endomeetriumisse tuleb sellel läbida tihedasti paiknevate epiteelirakkude kiht. *In vitro* katsete põhjal on võimalik oletada, et retseptiivses faasis olevate emaka epiteelirakkudes toimub steroidhormoonide toimel EMT ning blastotsüsti adhesioon süvendab seda fenotüüpi veelgi. Mesenhümaalse fenotüübiga rakkude vahel nõrgenevad liidused ning nad muutuvad liikuvaks, võimaldades embrüol epiteelist läbi tungida. Hiljem kaetakse implantatsioonikoht uuesti epiteeliga (Uchida jt, 2012).

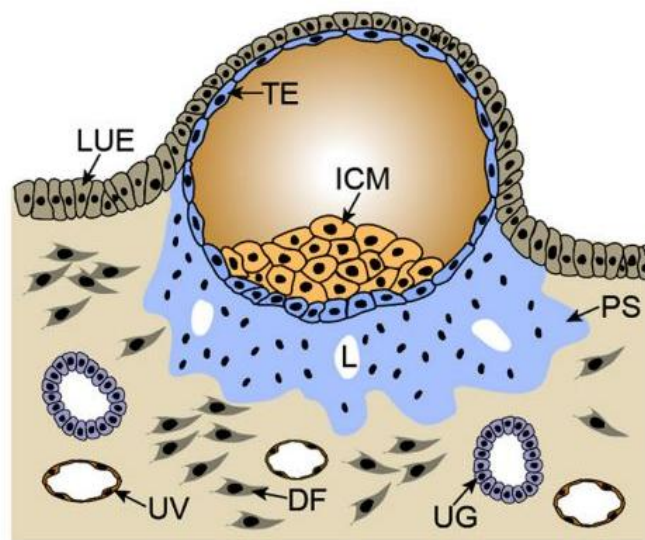
Embrüo implantatsiooniks ja platsenta arenguks on vaja, et toimuks tihe suhtlus embrüo ja ema kudede vahel. Jak/STAT signaalirada aktiveeriv LIF on oluline tsütokiin raseduse varajases staadiumis toetades embrüo arengut, implantatsiooni ning platsenta moodustumist. *LIF* ekspressiooni reguleeritakse IL-1, TNF, PDGF ja EGF kaudu. Sekretoorses faasis oleva endomeetriumi poolt sekreteeritav hepariini siduv EGF-sarnane kasvufaktor (ingl *heparin-binding EGF-like growth factor*, HBEGF) aitab embrüol jõuda blastotsüsti staadiumini, vabaneda *zona pellucidast*, implanteeruda ning muuta trofoblastid invasiivseks. Samuti osaleb HBEGF endomeetriumi enda valmistumisel embrüo vastuvõtmiseks. Samuti on näidatud Wnt signalisatsiooniraja olulisust blastotsüsti ja emaka vahelises suhtluses, implantatsioonis, trofoblastide invasioonis ja detsidualiseerumises. Häired nendes signaaliradades võivad põhjustada viljatust (Fritz jt, 2014).

1.2.2. Trofoblastid

Ovuleerunud munaraku viljastumine toimub munajuha ampullaarosas, millele järgneb sügoodi lõigustumine ning kui see on jõudnud kaheksa raku staadiumini, siis tekib moorula. Kompaktsiooni tulemusena tekib blastotsüst, milles on eristatavad kaks rakupopulatsiooni: trofoblastid ja embrüoblastid (Hussar jt, 2005). Apositsiooni faasis eemaldatakse *zona pellucida*, mis võimaldab blastotsüstil tugevamalt endomeetriumile kinnituda (adhesioonifaas) (Diedrich jt, 2007). Inimese blastotsüst implanteerub emaka seinale sisemise rakumassi (ingl *inner cell mass*, ICM) poole jäävate polaarsete trofektodermi rakkude kaudu. Selles protsessis osalevate adhesioonimolekulide interakteerumine mõjutab rakkude diferentseerumist ja proliferatsiooni (James jt, 2012). Emaka epiteeliga otseses kontaktis olevad trofoblastid

ühinevad moodustades hulgituumseid jagunemisvõimetuid ST-e, mis on ainukesena võimelised tungima läbi emaka epiteeli stroomasse (Joonis 2). Ülejäänusid ühetuumseid rakke nimetatakse tsütotrofoblastideks, millest tekivad nii uued ST-d kui ka teised raseduse käigus ilmuvad trofoblastide tüübid (Huppertz jt, 2012).

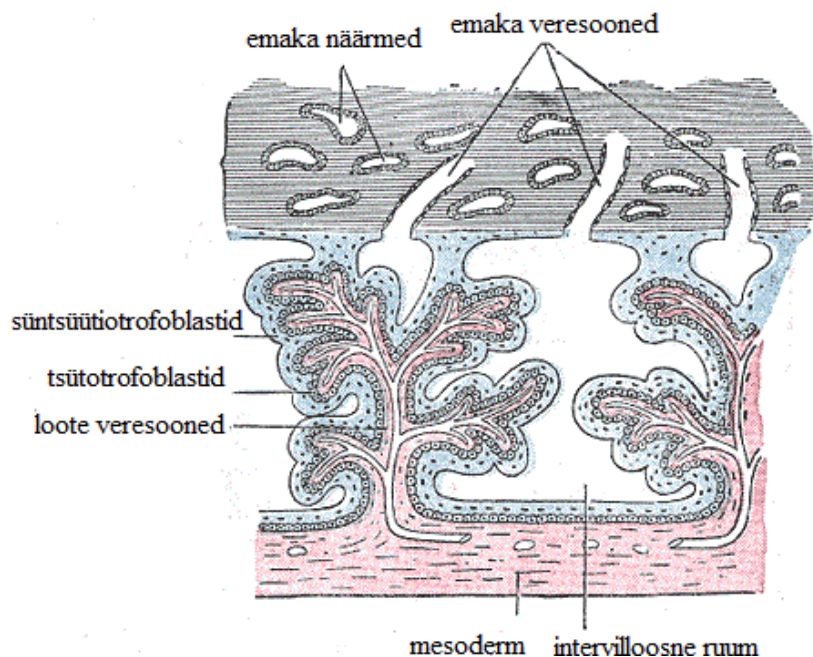
Blastotsüsti tungimisel emaka kudedesse kujundatakse seriiniproteaaside ja metalloproteinaaside (MMP2 ja MMP9) abil ümber emaka ECM ning selleks, et teha ruumi kasvavale embrüole, kutsutakse endomeetriumi rakkudes esile apoptoosi. Primitiivsed ST rakud sekreteerivad ümbritsevat detsiidu lagundavaid ensüüme, tekitades hattudevahelise ruumi eelkäijaid – lakuune (Joonis 2). Tsütotrofoblastide ja mesenhüümi rakkude proliferatsiooni ja migratsiooni tulemusena moodustuvad raseduse neljandaks nädalaks lootehatud (James jt, 2012).



Joonis 2. Blastotsüsti tungimine läbi endomeetriumi epiteeli. Blastotsüst kinnitub endomeetriumi trofektodermi (TE) kaudu sisemise rakumassi (ICM) poolse küljega ning tungib läbi luminaalse emaka epiteeli (LUE). Trofoblastide ühinemise tulemusena moodustub hulgituumne primitiivne süntsüütium (PS), mille poolt sekreteeritud ensüümide toimetel moodustuvad lakuunid (L). Trofoblastide proliferatsiooni ja migratsiooni tulemusena tekib osadel lakuunidel ühendus emaka veresoontega (UV) või emaka näärmetega (UG) (Knofler ja Pollheimer, 2013).

Lootehatte katab kaks kihti villoosseid trofoblaste: välimises kihis asuvad ema kudedega otseses kontaktis olevad ST-d ning nende all asub kiht tsütotrofoblaste (Huppertz jt, 2012). Tsütotrofoblastid sekreteerivad angiogeenseid faktoreid, mis indutseerivad platsenta veresoonte teket. ST-d sünteesivad platsentale iseloomulikke peptiid- ja steroidhormoone, osalevad toitainete transpordis ning kaitsevad arenevat loodet ksenobiootikumide vastu (Burton ja Fowden, 2015). Lootehattude sisemuses paiknevad ka loote veresooned (Joonis 3).

Lootehattude otstes tekib paljunevatest tsütotrofoblastidest trofoblastisammas, milles olevad rakud kaotavad diferentseerudes oma proliferatsioonivõime, kuid muutuvad invasiivseks ning tungivad läbi süntsüütiumi emaka stroomasse. Lootehattudest eraldunud trofoblaste nimetatakse EVT-ks. Raseduse kulgedes võivad need rakud jääda endomeetriumi stroomasse, liikuda kuni müomeetriumi, tungida emaka spiraalarteritesse (endovaskulaarsed trofoblastid) või emaka näärmetesse (endoglandulaarsed trofoblastid). Endovaskulaarsete trofoblastide ülesanneteks on takistada ema vere juurdepääsu lootenii raseduse esimese 10 nädala jooksul, et tagada loote varajaseks arenguks vajalik madala hapnikusisaldusega keskkond ning suurendada järk-järgult spiraalarterite läbimõõtu, et tagada loote piisav hapniku ja toitainetega varustatus hilisemas arengus (Huppertz jt, 2012). Hüpopksia tingimustes aktiveeritakse transkriptsioonifaktor HIF, mis mõjutab trofoblastide diferentseerumist, platsenta arengut ning loote morfogeneesi (Dunwoodie, 2009). Endoglandulaarsete trofoblastide kaudu luuakse ühendus emaka näärmete ja intervilloosse ruumi vahel ning see võimaldab areneval lootel tarbida näärmete sekreedis sisalduvaid olulisi toitaineid. Oma migratsiooni jooksul puutuvad EVT-d kokku ka emaka immuunrakkudega (Huppertz jt, 2012).



Joonis 3. Lootehatud. 10. nädalast on emaka veresooneid ühenduses intervilloosse ruumiga. Lootehatte katab hulgituumsete süntsüütiotrofoblastide kiht ning selle all paiknevad ühetuumsed tsütotrofoblastid. Lootehattude sisemuses paiknevad loote veresooneid. Modifitseeritud joonis UNSW Embryology veebilehelt.

Võrreldes teiste imetajatega on inimese trofoblastid äärmiselt invasiivsed. Trofoblastide tungimine sügavale emaka kudedesse ning spiraalarterite ümberkujundamine võimaldab

lootel saada rohkem toitaineid ja hapnikku. Suurenenud toitainete- ja hapnikuvajadus võib olla tingitud inimese suurest ajumahust ja bipedaalsusest. Trofoblastide invasioon peab olema täpselt kontrollitud. Liigne invasioon (nt tubulaarne rasedus) võib tuua kaasa ema jaoks eluohtliku verejooksu, seevastu vähene invasioon ja sellega koos ka vähenenud hapniku ja toitainetega varustatus võib tuua kaasa loote enneaegsuse, kasvupeetuse, nurisünnituse või pre-eklampsia (Moffett ja Loke, 2006).

1.2.3. Sarnasused trofoblastide ja vähirakkude vahel

Kuigi platsenta on normaalne kude, on selle moodustamisel osalevatel trofoblastidel mitmeid sarnasusi vähirakkudega: kontaktinhibitsiooni puudumine, suur proliferatsiooni-, migratsiooni- ja invasioonivõime ning suutelisus jääda immuunsüsteemi efektorrakkudele märkamatuks.

Lootehattude sambas intensiivselt prolifereeruvad villoossed trofoblastid sarnanevad oma fenotüübilt transformeerunud rakkudele, kuid diferentseerudes invasiivseks kaotavad nad proliferatsiooni- ja invasioonivõime. Seevastu invasiivsete EVT-de fenotüüp sarnaneb metastaatilistele vähirakkudele. Trofoblastide ja vähirakkude käitumuslikud sarnasused tulenevad eelkõige sarnasusest mitmete geenide (proto-onkogeenid, kasvufaktorid, membraanireseptorid, ensüümid) ekspressioonis.

Proto-onkogeenide aktiveerumine on üks esimesi samme rakkude transformeerumisel. On tähelepanuväärne, et proto-onkogeenid ekspresseeruvad trofoblastides eelkõige raseduse esimestel nädalatel, mil nende rakkude proliferatsiooni-, migratsiooni- ja invasioonivõime on kõige suurem. Tsütotrofoblastides ja ST-des ekspresseeruvad näiteks türosiinkinaasne retseptor EGFR ning membraanseoseline GTPaas Ras. Varajastes EVT-des ekspresseeruva transkriptsioonifaktori *c-myc* ning PDGF B subühiku tase on võrreldav nende samade geenide ekspressioonitasemega kasvajaslikes rakuliinides.

Normaalsed rakud vajavad rakutsükli käivitamiseks läbi membraanretseptorite tulevaid mitogeenseid signaale, milleks võivad olla kasvufaktorid, ECM komponendid või rakkudevahelised adhesioonimolekulid. Tsütotrofoblastides ekspresseerub sarnaselt kasvajakrakkudele näiteks EGF/EGFR, PDGF-sarnane kasvufaktor ning selle retseptor, insuliini-sarnane kasvufaktor 1 (ingl *insulin-like growth factor 1*, IGF-1) ning selle retseptor ja LIF retseptor; ST-des ekspresseerub transformeeriv kasvufaktor β (ingl *transforming growth factor \beta*, TGF- β) ja EVT-des VEGF/VEGFR. Kasvufaktorite ja nende retseptorite

aktiveerimine viib nii kasvajates kui trofoblastides näiteks MAPK/ERK signaaliraja (proliferatsioon ja migratsioon), PI3K/AKT signaaliraja (proliferatsioon, elulemus, migratsioon) ja FAK (proliferatsioon ja migratsioon) autokriinsele aktiveerimisele. Samuti stimuleeritakse nii platsentas kui kasvajates parakriinsete signaalidega ka oma naaberrakkude proliferatsiooni näiteks VEGF/VEGFR signalisatsiooniga, mille ülesreguleerimisel on oluline roll HIF-del.

Invasioon ja migratsioon on omavahel seotud protsessid, mis nõuavad raku ja teda ümbritseva mikrokeskkonna vaheliste ühenduste muutumist ja rakuväliste proteaaside aktivatsiooni. Nii trofoblastides kui ka kasvajates ekspresseeruvad ECM-t lagundavad ensüümid (MMP1, MMP2, MMP9) ja nende ensüümide aktiivsust inhibeerivad valgud (TIMP-1). Invasiivsetel trofoblastidel toimuvad olulised muutused ka adhesioonimolekulide (integrinid, kaderiinid, immunoglobuliini superperekonna valgud) ekspressioonis, et kohaneda neid ümbritseva mikrokeskkonna muutustega. Adhesioonimolekulide seostumisel ligandiga võivad aktiveeruda FAK, MAPK/ERK signaalirada või PI3K/AKT signaalirada.

Kuigi trofoblastidel ekspresseeruvad ka isapoolsed antigeenid, ei teki normaalse raseduse korral loote vastu äratõukereaktsiooni. Immuunsüsteemile märkamatuks jäämiseks kasutavad trofoblastid ja kasvajad põhilise koesobivuskompleksi I (ingl *major histocompatibility complex I*, MHC I) mitteeksponeerimist, loomulike tappurrakkude (ingl *natural killer cells*) inhibeerimist ning immuunrakkudes apoptoosi esilekutsumist.

Põhiline erinevus trofoblastide ja vähirakkude vahel seisneb selles, et trofoblastide proliferatsioon ja invasiivsus on range ajalise ja ruumilise kontrolli all (Ferretti jt, 2007).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärkideks oli:

- 1) Töötada välja uued membraanseoselisi mutsiine äratundvad monoklonaalsed antikehad (MAK) ning iseloomustada nende spetsiifilisust;
- 2) võrrelda valgu ja mRNA tasemel transmembraansete mutsiinide ekspressiooni erinevusi trofoblasti rakuliinides JAR, JEG-3 ja HTR-8/SVneo ning endomeetriumi retseptiivses rakuliinis RL95-2 ja mitteretseptiivses rakuliinis HEC-1A.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Kasutatud rakuliinid

Käesolevas töös kasutati inimese koorionikartsinoomi rakuliine JAR ja JEG-3 ning inimese esimese trimestri ekstravilloosete trofoblastide rakuliini HTR-8/SVneo, mis on immortaliseeritud simiani viiruse 40 suure T antigeeniga. JEG-3 ja HTR8/SVneo rakuliinide fenotüüp sarnaneb invasiivsetele ekstravilloosetele trofoblastidele ning JAR rakuliini fenotüüp villossetele trofoblastidele (Hannan jt, 2010; Weber jt, 2013). Kõiki trofoblasti rakuliine kasvatati RPMI 1640 söötmes, kuhu oli lisatud 10% veise loote seerumit ning 1% penitsilliini ja streptomütsiini.

Endomeetriumi rakuliinidest kasutati adhesiivsete omadustega kartsinoomi rakuliini RL95-2 ning mitteadhesiivse adenokartsinoomi rakuliini HEC-1A. RL95-2 rakuliin on laialdaselt kasutusel retseptiivse ning HEC-1A rakuliin mitteretseptiivse endomeetriumi mudelina (Hannan jt, 2010). RL95-2 rakke kasvatati IMDM söötmes ning HEC-1A rakke McCoy söötmes. Söötmetesse lisati 10% veise loote seerumit ning 1% penitsilliini ja streptomütsiini.

Lisaks kasutati käärsoolekartsinoomi rakuliini HCT116, erütroleukeemia rakuliini K562, pankrease adenokartsinoomi rakuliini Capan2, käärsoole adenokartsinoomi rakuliini Caco2, rinnanäärme adenokartsinoomi rakuliini MCF7, pankrease kartsinoomi rakuliini PANC1 ja embrüonaalse neeru rakuliini HEK293.

Kõiki rakke kasvatati 5% CO₂ juuresolekul veeauruga küllastatud atmosfääris 37°C juures.

2.2.2. Kasutatud antikehad

Immunoblottingu ja immunofluorestsentsmikroskoopia katsetes kasutatud antikehade ülevaade on toodud lisas (Lisa 1).

2.2.3. Rakkude lüüsimine

Petri tassil kasvatatud rakke pesti 3x PBS-ga. Rakkude lüüsimine teostati jääl. Rakud suspendeeriti 500 µl RIPA lüüsi puhvris (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,3% nPa40; 0,3% Triton X-100; 0,3% Na-deoksükolaat; 0,1% SDS), millele oli lisatud proteaaside inhibiitoreid (5 µl 100 mM PMSF etanoolis, 0,5 µg aprotiniini ja 0,5 µl 2 mM leupeptiini). Rakud hõõruti tassi küljest lahti ning hoiti 45 min lüüsi puhvris. Lüüsitud rakke töödeldi ultraheliga 2x15 sekundit. Lüüsi puhvris lahustumatu materjal sadestati tsentrifuugides preparaate 16000 g ja 4°C juures 10 min. Saadud supernatandis mõõdeti valguhulk NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, USA). Rakulüsaate säilitati -20°C juures.

2.2.4. Valkude SDS-polüakrüülamiidgeel elektroforees ja *Western blot* analüüs

Rakulüsaadid segati 2x proovipuhvriga (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 24% glütserooli; 8% SDS; 3,1% DTT; broomfenoolsinine) või 6x proovipuhvriga (0,35 M Tris-HCl pH 6,8; 26% glütserooli; 10% SDS; 9,3% DTT; broomfenoolsinine) ning kuumutati 95°C juures 5 minutit. Valgud lahutati 8%, 10% või 12% SDS-polüakrüülamiidgeeli abil. Valkude molekulmassi markerina kasutati PageRuler Plus Prestained Protein Ladderit (Thermo Scientific, USA). Valgud kanti geelilt Immobilon polüvinüülideendifluoriid (PVDF) membraanile (Millipore, USA) poolkuiva ülekande meetodiga 0,8 mA/cm² juures 2 h jooksul või märja meetodiga 100 V juures 1 h jooksul. Antikehade mittespetsiifilise seostumise vältimiseks inkubeeriti membraani 30 minutit või 1 h PBS puhvris, mis sisaldas 0,1% Tween-20 ja 1% kaseiini või 5% lõssipulbrit. Pärast blokeerimist inkubeeriti membraani üleöö 4°C juures loksutil primaarsete antikehadega või hübriidoomidelt eraldatud söötmega, mis olid lahjendatud PBS-s, millesse oli lisatud 0,1% Tween-20 või PBS-s, millesse oli lisatud 0,1% Tween-20 ja 5% lõssipulbrit. Seejärel pesti membraani PBS-ga, milles oli 0,1% Tween-20. Membraani inkubeeriti sekundaarse antikehaga 1 h toatemperatuuril loksutil PBS-s, milles oli 0,1% Tween-20 või PBS-s, milles oli 0,1% Tween-20 ja 5% lõssipulbrit. Membraani pesti PBS-Tween-20 lahusega ning sekundaarse antikeha seondumise tuvastamiseks kasutati

substraadina 3,3'-diaminobensidiini või inkubeeriti membraani 5 min kemoluminestsentsi esilekutsuvas lahuses (Millipore, USA) ja seejärel eksponeeriti röntgenfilmile (Agfa, Belgia) ning ilmutati vastavalt tootja protokollile.

2.2.5. Immunofluorestsentsmikroskoopia

Klaasile kinnitunud rakud fikseeriti 4% paraformaldehüüdiga 10 min toatemperatuuril. Fiksaator eemaldati ning rakke pesti 3 korda PBS-ga. Antikehade ebaspetsiifilise seondumise vältimiseks inkubeeriti rakke blokeerimislahuses (4% kitseseerumit PBS-s) 60 min ning pesti PBS-ga. Rakke inkubeeriti primaarsete antikehadega blokeerimislahuses 60 min toatemperatuuril ning pesti 3 korda PBS-ga. Siis inkubeeriti rakke sekundaarsete antikehadega blokeerimislahuses 30 min toatemperatuuril ning pesti 3 korda PBS-ga. Seejärel inkubeeriti rakke DAPI-ga PBS-s (1:2000) 15 min toatemperatuuril ning pesti 3 korda PBS-ga. Preparaadid sulundati Fluorescent Mounting Mediumiga (Dako, Taani) ning tulemusti analüüsiti fluorestsentsmikroskoobi Olympus IX81 abil.

2.2.6. RNA eraldamine ja cDNA süntees

Petri tassil kasvanud rakkudelt eemaldati sööde ning rakke pesti PBS-ga. Rakud võeti tassi küljest lahti trüpsiiniga, mille toime peatati seerumit sisaldanud söötmega. Rakud tõsteti ümber 15 ml tuubi ning tsentrifuugiti põhja. Rakke pesti PBS-ga tsentrifuugides.

RNA eraldamiseks kasutati Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit-i (Favorgen, USA). RNA eraldati vastavalt tootja protokollile. RNA elueeriti nukleaasivabas vees ning selle kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). RNA proove säilitati -80°C juures.

DNaasi töötluks ja cDNA sünteesiks kasutati kasutati RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-i (Thermo Scientific, USA) vastavalt tootja protokollile. Reaktsiooniks kasutati 1 µg rakkudest eraldatud RNA-d. cDNA proove säilitati -20°C juures.

2.2.7. Kasutatud oligonukleotiidid

Tabel 1. Töös kasutatud oligonukleotiidid

Praimer (F – <i>forward</i>, R – <i>reverse</i>)	Järjestus
MUC1 F	5' CGTCAGCGTGAGTGATGTG 3'
MUC1 R	5' CAGACAGCCAAGGCAATGAG 3'
MUC3 F	5' GACGACGGAACAGACAAGG 3'
MUC3 R	5' CCGCAGGGCTCACACTG 3'
MUC15 F	5' ACCAGTTCTGCGATTAGACAATG 3'
MUC15 R	5' TCATCCATAGGAATGCCATCAC 3'
GAPDH F	5' ACCATCTTCCAGGAGCGAG 3'
GAPDH R	5' TCCATGGTGGTGAAGACGC 3'

2.2.8. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i läbiviimiseks kasutati 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load (12,5 mM MgCl₂) lahust (Solis BioDyne, Eesti). Reaktsioon teostati 20 µl-s, mis sisaldas 4 µl 5x FIREPol Master Mix-i, 0,6 µl 10 µM *forward* praimerit, 0,6 µl 10 µM *reverse* praimerit, 50 ng cDNA-d ning vett. Reaktsiooni teostamiseks kasutati 2720 Thermal Cycler PCR seadet (Applied Biosystems, USA) ning järgmist programmi:

Tabel 2. PCR-i programm

Toiming	Temperatuur	Aeg
Algne denaturatsioon	95°C	5 min
Denaturatsioon	95°C	30 sek
Praimerite seondumine	50,5°C	30 sek
Süntees	72°C	40 sek
Lõplik süntees	72°C	10 min

} 30x

Reaktsiooniproduktide suurust analüüsiti 2% agarosgeeli abil TAE puhvris (40 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA) ning DNA tuvastamiseks UV-valguses lisati geelile etiitumbromiidi. DNA fragmentide suurusmarkerina kasutati GeneRuler 50 bp DNA Ladderit (Thermo Scientific, USA).

2.2.9. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR)

qPCR teostati LightCycler® 480 II (Roche, Šveits) seadmega ning reaktsioonid viidi läbi LightCycler® 480 Multiwell 384 plaadil (Roche, Šveits). Kõik katsed teostati duplikaatidena ning tulemuste analüüsimisel on kasutatud duplikaatide keskmisi. Iga reaktsioon mahuga 10 µl sisaldas 5 µl 2x Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-i (Thermo Scientific, USA), 0,5 µl 10 µM *forward* praimerit, 0,5 µl 10 µM *reverse* praimerit ja 10-50 ng nukleasivabas vees lahustatud cDNAd. Reaktsiooni teostamiseks kasutati järgmist programmi:

Tabel 3. qPCR programm

Toiming	Temperatuur	Aeg
Algne denaturatsioon	95°C	10 min
Denaturatsioon	95°C	15 s
Praimerite seondumine ja süntees	60°C	1 min
Lõplik süntees	72°C	5 min
Sulamiskõver	45-95°C	7 min

} 40x

LightCycler 480 tarkvara arvutas kõik lävitsükliid (ingl *cycle threshold*) automaatselt. Kõikide katsete tulemused normaliseeriti koduhoidja geenil glütseeraldehüüd 3-fosfaat dehüdrogenaas (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) väärtuste abil. Võimalike reaktsiooni käigus tekkivate lisaproductide esinemist vaadeldi sulamiskõveral. Suhteliste tasemete arvutamiseks kasutati Livaki meetodit (Livak ja Schmittgen, 2001).

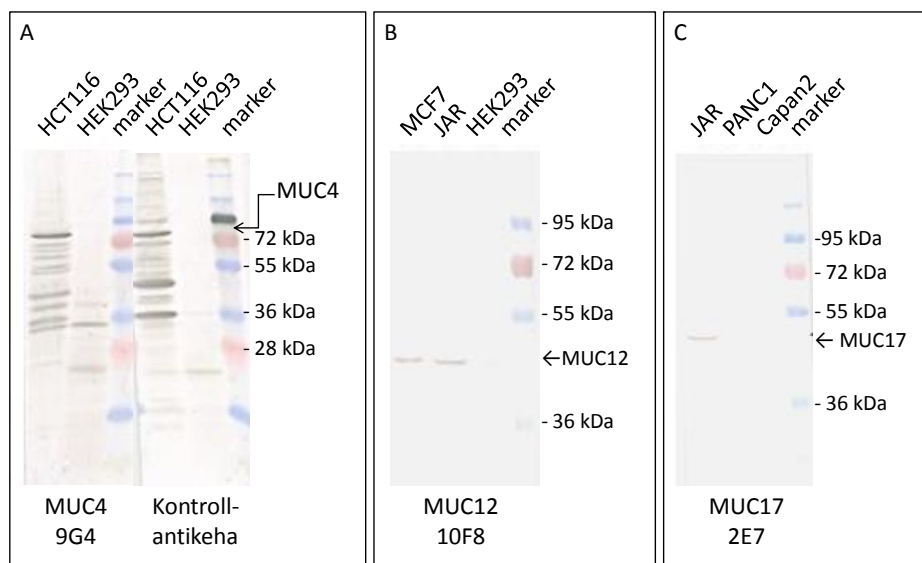
2.2.10. Andmete statistiline analüüs

qPCR-i katsed sooritati 2-3 korduses ning tulemused on esitatud korduste keskmistena koos veapiiridega. Veapiiridena kasutati standardvea väärtusi. Statistilise olulisuse hindamiseks kasutati MS Exceli t-testi. Statistiliselt oluliseks loeti p-väärtuseid $p < 0,05$.

2.3. Tulemused

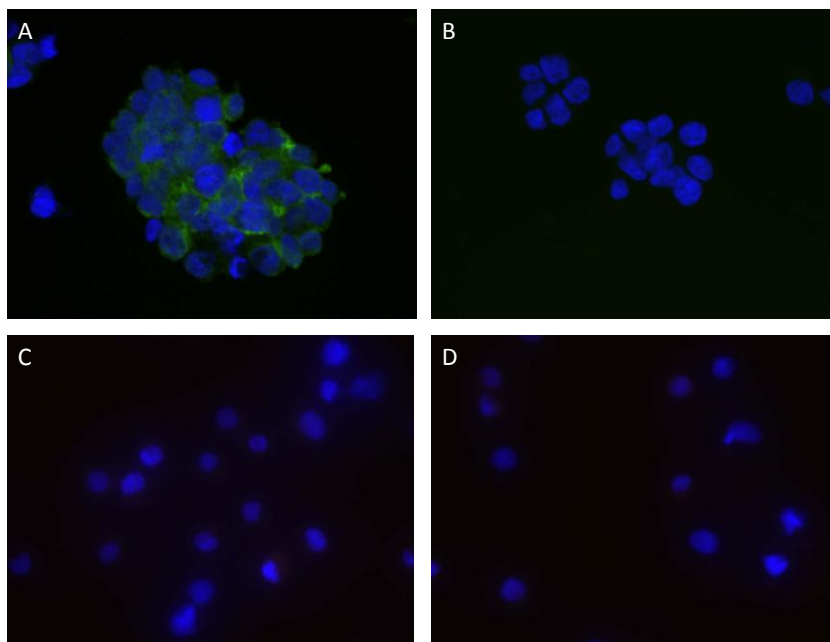
2.3.1. Uued mutsiinide vastased monoklonaalsed antikehad

Mutsiinide vastased uued monoklonaalsed antikehad töötas välja dr. Erkki Juronen käesoleva töö autori kaasabil. Membraanseoseliste mutsiinide (MUC1, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC17) vastaste uute monoklonaalsete antikehade iseloomustamiseks lahutati kõigepealt vastavat mutsiini ekspresseeriva rakuliini lüsaadi valgud SDS-polüakrüülamiid geelelektroforeesil. Valgud kanti *Western blot* meetodiga üle membraanile, mida inkubeeriti seejärel hübridoomidelt eraldatud söötmetega. Sekundaarse antikehana kasutati mädarõika peroksüdaasiga seotud hiire või küüliku IgG vastast kitse antikeha, mille seondumine membraanile tuvastati diaminobensidiini abil. Huvipakkuvate hübridoomide söötmetega korraldati katseid, et võrrelda antikehade reageerimist mutsiini ekspresseerivate ja mitteekspresseerivate rakuliinidega. Katsete tulemusel saadi 3 uut monoklonaalset antikeha 9G4, 10F8 ja 2E7, mis tunnevad ära vastavalt MUC4, MUC12 ja MUC17 valke (Joonis 4).



Joonis 4. Mutsiinide vastaste uute monoklonaalsete antikehade seostumise analüüs mutsiine ekspresseerivate ja mitteekspresseerivate rakkude lüsaatidega. A: MUC4 vastase MAK 9G4 võrdlus polüklooraalse antikehaga (Novus Biologicals) MUC4 positiivsel rakuliinil HCT116 ning negatiivsel rakuliinil HEK293. MUC4 valgu molekulmass on umbes 78 kDa. Mõlemad antikehad seostuvad teatud määral MUC4 fragmentidele või mittespetsiifiliselt teistele valkudele. **B:** MUC12 vastase MAK reaktsioon seda valku ekspresseerivate MCF7 ja JAR rakkude lüsaatidega ning mitteekspresseerivate HEK293 rakkude lüsaadiga. Antikeha tuvastab MUC12 ainult MCF7 ja JAR rakkude lüsaadis. MUC12 valgu molekulmass on umbes 42 kDa. **C:** MUC17 vastase MAK reaktsioon seda valku ekspresseeriva JAR rakkude lüsaadiga ning valgu mitteekspresseerivate PANC1 ja Capan2 rakkude lüsaatidega. Antikeha on reageerinud ainult JAR rakkude lüsaadiga. MUC17 valgu molekulmass on umbes 45 kDa.

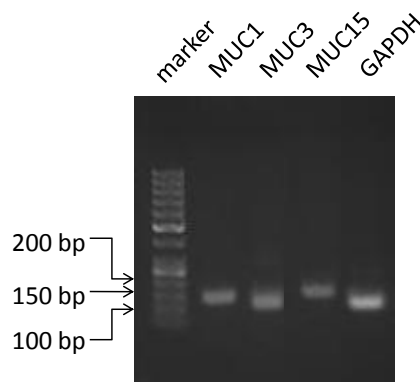
Järgmiseks uuriti saadud monoklonaalsete antikehade reageerimist klaasile kinnitunud ning paraformaldehüüdiga fikseeritud rakkudega kasutades immunofluorestsentsmikroskoopiat. MUC12 ja MUC17 vastased monoklonaalsed antikehad ei reageerinud selle meetodiga neid ekspresseerivate JEG-3 rakkudega. MUC4 vastane monoklonaalne antikeha reageeris seda ekspresseeriva JEG-3 rakuliiniga, samas ei esinenud reaktsiooni valku mitteekspresseeriva HEK293 rakuliiniga (Joonis 5).



Joonis 5. MUC4 vastase MAK 9G4 reageerimine fikseeritud rakkudega. A: MUC4 vastane MAK 9G4 reageerib seda valku ekspresseerivate JEG-3 rakkudega (roheline). Sekundaarse antikehana kasutati Alexa488-ga seotud hiire IgG vastast kitse antikeha. **B:** Negatiivne kontroll, mis näitab, et sekundaarne antikeha ei reageeri JEG-3 rakkudega. **C:** MUC4 vastane MAK 9G4 ei reageeri seda valku mitteekspresseerivate HEK293 rakkudega (punane). Sekundaarse antikehana kasutati Alexa594-ga seotud hiire IgG vastast kana antikeha. **D:** Negatiivne kontroll, mis näitab, et sekundaarne antikeha ei reageeri HEK293 rakkudega. Suurendus 400x.

2.3.2. Praimerite spetsiifilisus

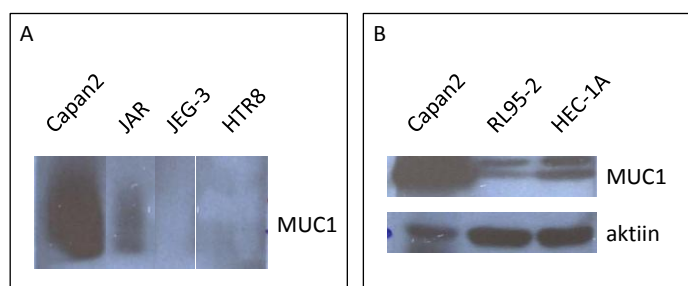
qPCR-s kasutatavate praimerite spetsiifilisuse ning võimalike valeproduktide ja praimerite dimeeride tekke analüüsimiseks kasutati PCR meedotit. Reaktsioonis kasutati JAR rakkudest pärit cDNA-d ning produktid lahutati agarose geleelektroforeesiga. Kõikide praimeritega saadi sobiva pikkusega produktid ning valeprodukte ei esinenud (Joonis 6).



Joonis 6. Praimerite spetsiifilisuse hindamine PCR meetodiga. Geelelektroforeesiga lahutatud PCR produktide ennustatud suurused on MUC1 – 138 bp, MUC3 – 117 bp, MUC15 – 138 bp ja GAPDH – 95 bp. Üheski reaktsioonis pole tekkinud praimerite dimeere ega muid vale suurusega lisaprojekte.

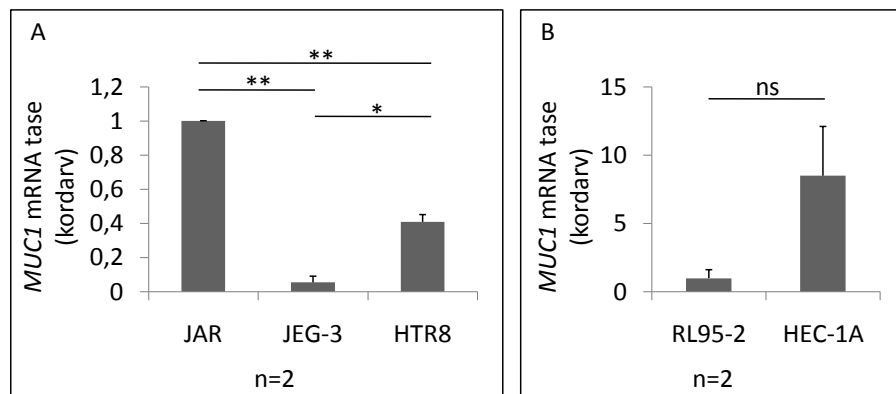
2.3.3. MUC1 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides

MUC1 valgu hulga võrdlemiseks trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides lahutati rakulüsaatide valgud SDS-geelelektroforeesil. Positiivse kontrollina kasutati kõrge MUC1 ekspressiooni tasemega Capan2 rakulüsaati. Valgud kanti *Western blot* meetodiga membraanile, mida inkubeeriti seejärel MUC1 vastase antikehaga. Endomeetriumi rakuliinides mõõdeti valgu üldhulk ning see võrdsustati väikseima valguhulgaga lüsaadi suhtes. Elektroforeesi geelile kantud valgu üldhulga võrdlemiseks kasutati koduhoidjageeni β -aktiini vastast antikeha. Sekundaarsete antikehadena kasutati mädarõika peroksüdaasiga seotud küüliku IgG vastast kitse antikeha. Tulemused ilmutati röntgenfilmile. MUC1 valgu olemasolu tuvastati trofoblasti rakuliinis JAR ja endomeetriumi rakuliinides RL95-2 ja HEC-1A (Joonis 7).



Joonis 7. MUC1 valgu taseme võrdlus trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides. A: Trofoblasti rakuliinidest tuvastati MUC1 valgu olemasolu ainult JAR rakkude lüsaadist. Valkude lahutamine teostati 10% polüakrüülamiidgeeli abil redutseeritud tingimustes. **B:** MUC1 valk esines mõlemas endomeetriumi rakuliinis. HEC-1A rakuliinis oli ekspressioon võrreldes RL95-2-ga kõrgem. Valkude lahutamine teostati 8% polüakrüülamiidgeeli abil redutseeritud tingimustes.

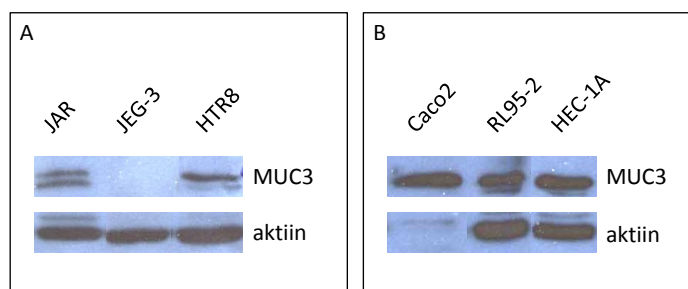
MUC1 mRNA taseme võrdlemiseks erinevates trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides kasutati qPCR-i läbiviimiseks vastavatest rakkudest pärit RNA alusel sünteesitud cDNA-d. Suhteliste tasemete arvutamiseks kasutati koduhoidjageeni *GAPDH* väärtuseid. Trofoblasti rakuliinide vahel esinevad MUC1 mRNA taseme erinevused olid statistiliselt olulised (Joonis 8 A). Kahe endomeetriumi rakuliini vahel ei olnud statistiliselt olulist MUC1 mRNA taseme erinevust (Joonis 8 B).



Joonis 8. MUC1 mRNA suhteline tase trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides. **A:** Trofoblasti rakuliinides esines kõrgeim MUC1 mRNA tase JAR-s. HTR8/SVneo rakuliinis oli MUC1 mRNA tase umbes poole madalam kui JAR rakkudes. JEG-3 rakuliinis oli MUC1 mRNA tase kõige madalam. MUC1 mRNA taseme erinevused trofoblasti rakuliinide vahel olid statistiliselt olulised. **B:** Endomeetriumi rakuliinis HEC-1A oli MUC1 mRNA tase kõrgem kui RL95-2-s, kuid see tulemus polnud statistiliselt oluline. n – katsete arv; **p<0,01; *p<0,05; ns tähistab statistiliselt mitteolulist erinevust.

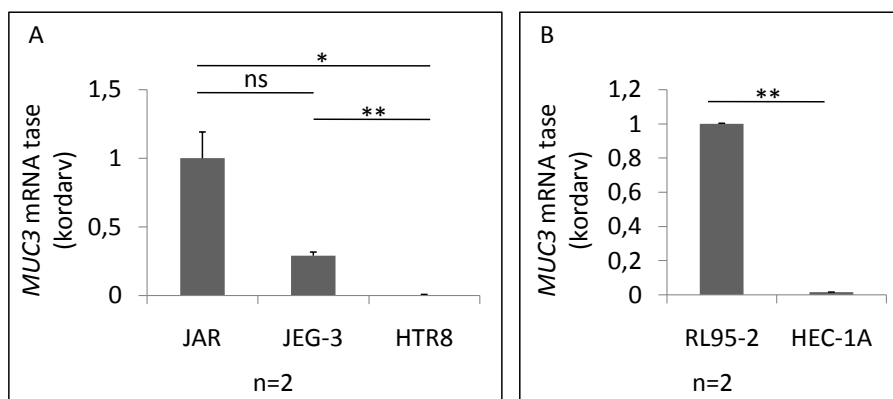
2.3.4. MUC3 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides

Selleks, et hinnata MUC3 valgu taseme erinevusi trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides teostati immunoblot analüüs. Positiivse kontrollina kasutati kõrge MUC3 ekspressiooni tasemega Caco2 rakkude lüsaati. Trofoblasti rakuliinide JAR, JEG-3, HTR8/SVneo lüsaatides mõõdeti ära valgu üldhulk ning see võrdsustati kõige väiksema valguhulgaga lüsaadi suhtes. Elektroforeesi geelile kantud valgu üldhulga võrdlemiseks kasutati β -aktiini vastast antikeha. Selgus, et uuritud kolme trofoblasti rakuliini vahel on erinev MUC3 valgu ekspressiooni tase (Joonis 9 A), seevastu endomeetriumi rakuliinide vahel MUC3 valgu taseme erinevust ei tuvastatud (Joonis 9 B).



Joonis 9. MUC3 valgu taseme võrdlus trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides. **A:** Trofoblasti rakuliinidest oli MUC3 valgu ekspressiooni tase JAR ja HTR8/SVneo rakkude lüsaatides sarnane, seevastu JEG-3 rakkudes MUC3 valku ei tuvastatud. Valgud lahutati 10% polüakrüülamiidgeeli abil redutseeritud tingimustes. **B:** Endomeetriumi rakuliinides RL95-2 ja HEC-1A esines sarnane MUC3 valgu ekspressiooni tase. Valgud lahutati 12% polüakrüülamiidgeeli abil redutseeritud tingimustes.

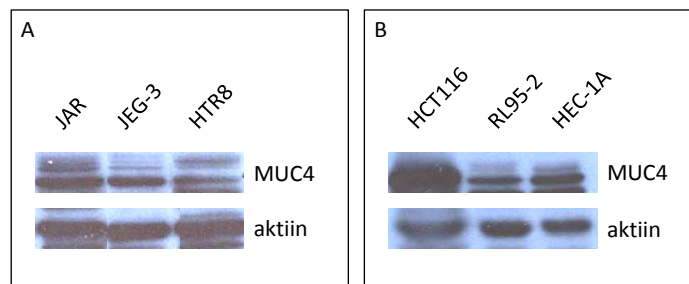
MUC3 mRNA taseme võrdlemiseks erinevates trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides kasutati qPCR-i läbiviimiseks vastavatest rakkudest pärit RNA alusel sünteesitud cDNA-d. Suhteliste tasemete arvutamiseks kasutati koduhoidjageeni *GAPDH* väärtuseid. Trofoblasti rakuliinidest esines kõrgeim MUC3 mRNA tase JAR rakkudes ning madalaim HTR8/SVneo rakkudes. JAR ja JEG-3 rakkudes esinev MUC3 mRNA taseme erinevus oli võrreldes HTR8/SVneo rakkudega statistiliselt oluline. MUC3 mRNA taseme erinevus JAR ja JEG-3 rakkude vahel polnud statistiliselt oluline (Joonis 10 A). Endomeetriumi rakuliinidest esines kõrgem MUC3 mRNA tase RL95-2 rakkudes ning HEC-1A rakkudega võrreldes oli see tulemus statistiliselt oluline (Joonis 10 B).



Joonis 10. MUC3 mRNA suhteline tase trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides. **A:** Trofoblasti rakuliinidest esines kõrgeim MUC3 mRNA tase JAR rakkudes. JEG-3 rakkudes oli vähem MUC3 mRNA-d ning kõige madalam MUC3 mRNA tase oli HTR8/SVneo rakkudes. **B:** Endomeetriumi rakuliinidest oli MUC3 mRNA tase kõrgem RL95-2 rakkudes ning madalam HEC-1A rakkudes. Kahe endomeetriumi rakuliini vaheline MUC3 mRNA taseme erinevus oli statistiliselt oluline. n – katsete arv; **p<0,01; *p<0,05; ns tähistab statistiliselt mitteolulist erinevust.

2.3.5. MUC4 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides

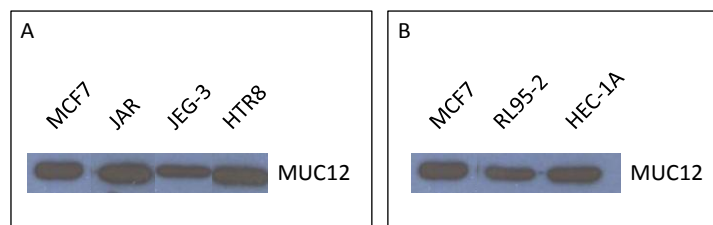
MUC4 valgu hulga võrdlemiseks trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides kasutati immunoblot meetodit. Positiivse kontrollina kasutati kõrge MUC4 ekspressiooni tasemega HCT116 rakkude lüsaati. Trofoblastide ja endomeetriumi rakkude lüsaatide üldine valgu hulk võrdsustati eelpoolkirjeldatud viisil. Elektroforeesi geelile kantud üldise valgu hulga võrdlemiseks kasutati β -aktiini vastast antikeha. Kõikides uuritud trofoblasti rakuliinides esines MUC4 valk, kuid HTR8/SVneo rakuliinis oli valgu tase võrreldes teiste trofoblasti rakuliinidega madalam (Joonis 11 A). MUC4 valgu olemasolu tuvastati ka mõlemas endomeetriumi rakuliinis (Joonis 11 B).



Joonis 11. MUC4 valgu taseme võrdlus trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides. **A:** MUC4 valk esines kõigis uuritud trofoblasti rakuliinides. HTR8/SVneo rakkudes oli MUC4 valgu tase madalam kui teistes trofoblasti rakuliinides. Valgud lahutati 10% polüakrüülamiidgeeli abil redutseeritud tingimustes. **B:** Endomeetriumi rakuliinides RL95-2 ja HEC-1A oli MUC4 valgu tase sarnane. Valgud lahutati 8% polüakrüülamiidgeeli abil redutseeritud tingimustes.

2.3.6. MUC12 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides

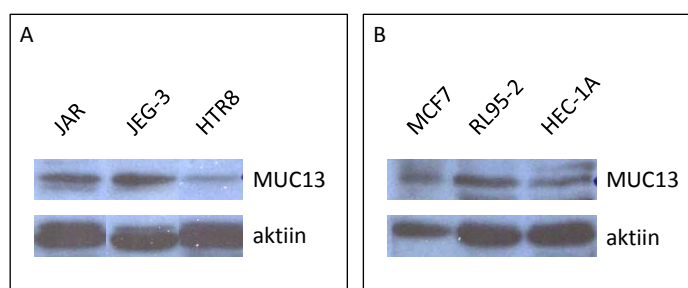
MUC12 valgu hulga tuvastamiseks trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides kasutati immunoblot meetodit. Positiivse kontrollina kasutati MUC12 ekspresseerivat MCF7 rakkude lüsaati. Kuna MUC12 ja β -aktiini valkude molekulmassid on peaaegu kokkulangevad (vastavalt 42 ja 43 kDa), siis β -aktiini vastast antikeha ei kasutatud. Kõigis uuritud trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides tuvastati MUC12 valgu esinemine (Joonis 12).



Joonis 12. MUC12 valgu tuvastamine trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides. **A:** Kõigis kasutatud trofoblasti rakuliinides esines MUC12 valk. **B:** Mõlemas kasutatud endomeetriumi rakuliinis esines MUC12 valk. Valgud lahutati 12% polüakrüülamiidgeeli abil redutseerivates tingimustes.

2.3.7. MUC13 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides

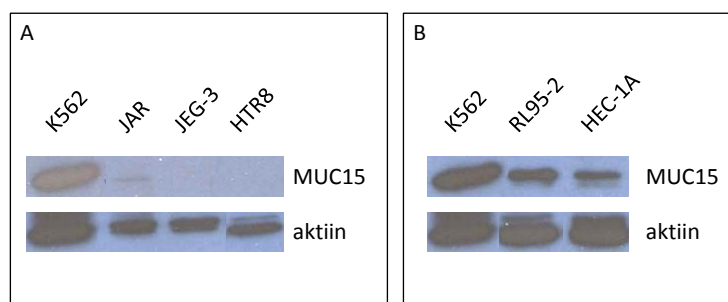
MUC13 valgu hulga võrdlemiseks trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides kasutati immunoblot meetodit. Positiivse kontrollina kasutati MUC13 ekspresseerivat MCF7 rakkude lüsaati. Trofoblastide ja endomeetriumi rakkude lüsaatide üldine valgu hulk võrdsustati eelpoolkirjeldatud viisil. Elektroforeesi geelile kantud üldise valgu hulga võrdlemiseks kasutati β -aktiini vastast antikeha. MUC13 valk esines kõigis kasutatud trofoblasti rakkudes, kusjuures HTR8/SVneo rakkudes oli valgu tase madalam kui JAR ja JEG-3 rakkudes (Joonis 13 A). Endomeetriumi rakkudes RL95-2 ja HEC-1A oli MUC13 valgu tase sarnane (Joonis 13 B).



Joonis 13. MUC13 valgu taseme võrdlus trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides. **A:** Trofoblasti rakuliinidest esines JAR ja JEG-3 rakkudes kõrgem MUC13 valgu tase kui HTR8/SVneo rakkudes. Valgud lahutati 10% polüakrüülamiidgeeli abil redutseeritud tingimustes. **B:** Endomeetriumi rakuliinides RL95-2 ja HEC-1A oli sarnane MUC13 valgu tase. Valgud lahutati 8% polüakrüülamiidgeeli abil redutseeritud tingimustes.

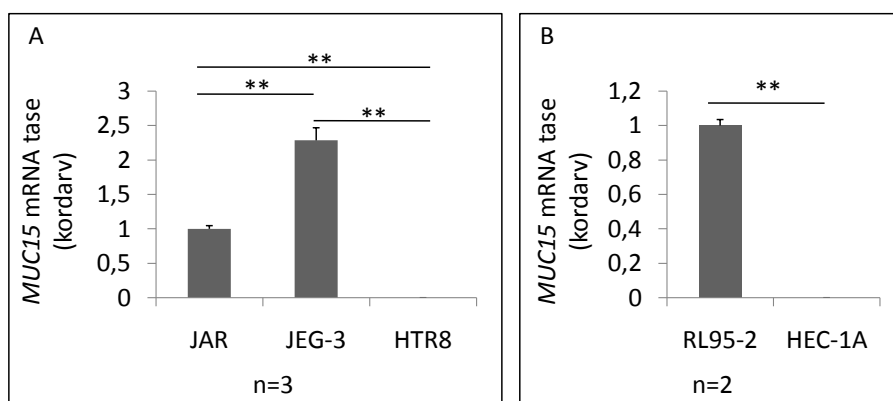
2.3.8. MUC15 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides

MUC15 valgu hulga võrdlemiseks trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides kasutati immunoblot meetodit. Positiivse kontrollina kasutati kõrge MUC15 ekspressiooni tasemega K562 rakuliini. Trofoblastide ja endomeetriumi rakkude lüsaatide üldine valgu hulk võrdsustati eelpoolkirjeldatud viisil. Elektroforeesi geelile kantud üldise valgu hulga võrdlemiseks kasutati β -aktiini vastast antikeha. Trofoblasti rakuliinidest tuvastati MUC15 valgu olemasolu ainult JAR rakkudes, kuid mitte JEG-3 ega HTR8/SVneo rakkudes (Joonis 14 A). Endomeetriumi rakuliinidest esines RL95-2 rakkudes rohkem MUC15 valku kui HEC-1A rakkudes (Joonis 14 B).



Joonis 14. MUC15 valgu taseme võrdlus trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides. **A:** Trofoblasti rakuliinidest tuvastati MUC15 valgu olemasolu JAR rakkudes. JEG-3 ja HTR8/SVneo rakkudes ei esinenud MUC15 valku. **B:** Mõlemas endomeetriumi rakuliinis tuvastati MUC15 valgu olemasolu, kusjuures RL95-2 rakkudes oli valgu kogus suurem kui HEC-1A rakkudes. Valgud lahutati 12% polüakrüülamiidgeeli abil redutseeritud tingimustes.

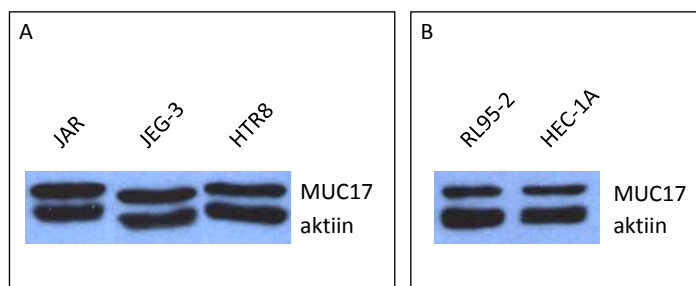
MUC15 mRNA taseme võrdlemiseks trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides teostati qPCR kasutades nendest rakkudest eraldatud RNA alusel sünteesitud cDNA-d. Suhteliste tasemete arvutamiseks kasutati koduhoidjageeni *GAPDH* väärtuseid. Trofoblasti rakuliinidest tuvastati kõrgeim MUC15 mRNA tase JEG-3 rakkudes. JAR rakkudes oli mRNA tase madalam ning HTR8/SVneo rakkudes MUC15 mRNA-d ei tuvastatud (Joonis 15 A). Endomeetriumi rakuliinidest tuvastati MUC15 mRNA RL95-2 rakkudes, kuid mitte HEC-1A rakkudes (Joonis 15 B).



Joonis 15. MUC15 mRNA suhteline tase trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides. **A:** Trofoblasti rakuliinidest esines kõrgeim MUC15 mRNA tase JEG-3 rakkudes. JAR rakkudes oli mRNA tase madalam ning HTR8/SVneo rakkudes MUC15 mRNA-d ei tuvastatud. **B:** Endomeetriumi rakuliinidest tuvastati MUC15 mRNA olemasolu RL95-2 rakkudes. HEC-1A rakkudes MUC15 mRNA-d ei tuvastatud. Kõik tulemused olid statistiliselt olulised. n – katsete arv; **p<0,01.

2.3.9. MUC17 ekspressioon trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides

MUC17 valgu hulga võrdlemiseks trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides kasutati immunoblot meetodit. Trofoblastide ja endomeetriumi rakkude lüsaatide üldine valgu hulk võrdsustati eelpoolkirjeldatud viisil. Elektroforeesi geelile kantud üldise valgu hulga võrdlemiseks kasutati β -aktiini vastast antikeha. Kõigis trofoblasti rakuliinides oli sarnane MUC17 valgu tase (Joonis 16 A). Samuti oli sarnane MUC17 valgu tase endomeetriumi rakuliinide vahel (Joonis 16 B).



Joonis 16. MUC17 valgu taseme võrdlus trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides. A: Sarnane MUC17 valgu hulk tuvastati kõigis uuritud trofoblasti rakuliinides. **B:** Sarnane MUC17 valgu hulk tuvastati mõlemas uuritud endomeetriumi rakuliinis. Valgud lahutati 10% polüakrüülamiidgeeli abil redutseeritud tingimustes.

Kokkuvõttev tabel kõigi uuritud mutsiinide suhtelise valgu hulga ja mRNA taseme kohta uuritud trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides on tootud lisas (Lisa 2).

2.4. Arutelu

Käesolevas töös iseloomustati kolme uut membraanseoselise mutsiini vastast monoklonaalset antikeha 9G4, 10F8 ja 2E7, mis tunnevad ära vastavalt MUC4, MUC12 ja MUC17 valke. Töö põhirõhk langes aga membraanseoseliste mutsiinide ekspressioonimustri kirjeldamisele nii valgu kui ka mRNA tasemel erineva päritolu ja omadustega trofoblasti ning endomeetriumi rakuliinides.

Töös kirjeldatud monoklonaalsetest antikehadest kaks, MUC12 vastane 10F8 ja MUC17 vastane 2E7, tundsid immunoblot meetodiga spetsiifiliselt neile vastavat mutsiini, kuid ei töötanud fikseeritud rakkudel immunofluorestsentsmikroskoopias. Seevastu kolmas monoklonaalne antikeha, MUC4 vastane 9G4, seostus immunoblot meetodit kasutades lisaks MUC4-le veel mitme teise valguga, kuid töötas fikseeritud rakkudel mikroskoopias. Nende monoklonaalsete antikehade saamiseks immuniseeriti hiiri sünteetiliste peptiididega. Valkude SDS-PAGE elektroforees ja membraanile ülekanne *Western blot* meetodil toimub

denatureerivates tingimustes, mistõttu valgud omandavad lineaarse struktuuri ning antikehad saavad seostuda lineaarse epitoobiga. Seevastu mikroskoopia jaoks fikseeritud rakkudes on valkude struktuur lähedasem natiivsele olekule ning antikehad saavad seostuda epitoopidega, mille aminohapped ei pruugi valgu lineaarses järjestuses olla lähestikku. Seetõttu tuleb iga antikeha valideerida vastavalt kasutatavale uurimismeetodile. Lisaks võib immuniseerimiseks kasutatud peptiidi järjestus sarnaneda teistele rakulüsaadis esinevatele valkudele ning seetõttu võib antikeha seostuda mitme erineva valguga. Siinkohal on huvitav märkida, et 2011. aastal oli uurimustöodes kasutatavate antikehade turu suurus umbes 6,1 miljardit dollarit. Mitmete valkude vastu võib turul olla sadu antikehasid, kuid paljudel neist on probleeme spetsiifilisusega. Polükloonaalsetel antikehadel esinevad veel erinevate partiide vahelised variatsioonid, kuid samamoodi võivad monokloonaalsed aja jooksul muutuda või ebapiisavate puhastusmeetodite tõttu olla saastunud (Marx, 2013).

Varem on platsenta erinevates rakutüüpides uuritud ainult MUC1 (Jeschke jt, 2002; Shyu jt, 2008) ja MUC15 (Shyu jt, 2007) esinemist: mõlemad ekspresseeruvad põhiliselt villoossetes trofoblastides ning takistavad nende invasiooni. Käesolevas töös leiti samuti, et vähemalt valgu tasemel on MUC1 ja MUC15 ekspressioon kõrgem JAR rakuliinis, mis sarnaneb fenotüübilt villoossetele trofoblastidele. Teiste membraanseoseliste mutsiinide osas on uuritud ainult mRNA taset sünnitusjärgsest platsentast võetud biopsiatest (Shyu jt, 2007). Sealjuures ei võeta arvesse, et selline platsenta pole enam funktsioneeriv kude ning peale selle on platsentas esindatud väga erinevad rakutüübid. Antud töös uuriti seitsme membraanseoselise mutsiini esinemist kolmes erinevas trofoblasti rakuliinis (JAR, JEG-3, HTR8/SVneo). Saadud tulemused näitavad, et lisaks MUC1 ja MUC15-le esinevad trofoblasti rakuliinides erinevused ka MUC3, MUC4 ja MUC13 valkude ekspressioonis. Kusjuures MUC4 ja MUC12 mRNA-d ei ole siiani platsentas tuvastatud (Shyu jt, 2007). Kindlasti tuleks tulevikus uurida ka teiste membraanseoseliste mutsiinide ekspressiooni erinevas arengujärgus olevate platsentade erinevates rakutüüpides. Antud töös uuriti membraanseoseliste mutsiinide esinemist ja ekspressiooni taset trofoblasti rakuliinides, kuid mitte nende võimalikku funktsiooni. Kuna trofoblastid ja kasvajakasutavad prolifererumiseks, migreerumiseks ja immuunsüsteemi allasurumiseks samu molekulaarseid radasid, siis vääriks kindlasti uurimist, kas juba vähirakkudes kirjeldatud mutsiinide funktsioonid esinevad ka trofoblastides.

Endomeetriumis on siiani uuritud MUC1 ja MUC4 ekspressiooni dünaamikat (Brayman jt, 2004). Eelnevalt on kirjeldatud MUC1 kõrgeenenud ekspressiooni inimese retseptiivses endomeetriumis (Meseguer jt, 2001). Seevastu antud töös leiti, et nii MUC1 valgu kui ka

mRNA tase on kõrgem just mitteretseptiivse endomeetriumi rakuliinis HEC-1A. Siinkohal tuleb märkida, et endomeetriumi rakuliinide retseptiivsuse kriteeriumiks on adhesiivsus trofoblasti rakkudele ja blastotsüstidele. Nagu eespool märgitud, on RL95-2 rakud adhesiivsed ning HEC-1A rakud mitteadhesiivsed (Hannan jt, 2010). MUC1 võib olla implanteerumisel anti-adhesiivne (Chervenak ja Iillsley, 2000) ning see eemaldatakse implantatsiooni käigus endomeetriumi pinnalt (Meseguer jt, 2001). Seega kõrgem MUC1 ekspressioon retseptiivsete rakkude pinnal ei laseks nendel rakkudel trofoblastide ega blastotsüstidega seonduda. MUC4 ekspressiooni on inimese endomeetriumi erinevates tsükli faasides kirjeldatud üksnes mRNA tasemel ning see on ühtlaselt madal (Dharmaraj jt, 2014). Selles töös uuriti MUC4 ekspressiooni valgu tasemel, kuid sarnaselt eelöeldule ei tuvastatud erinevust retseptiivse ja mitteretseptiivse endomeetriumi rakuliinide vahel. Lisaks tuvastati käesolevas töös MUC15 ekspressiooni erinevus retseptiivse ja mitteretseptiivse endomeetriumi vahel nii mRNA kui ka valgu tasemel ning seda ka MUC3 mRNA osas. Kuid erinevalt MUC1-st oli nende ekspressioon kõrgem hoopis retseptiivses rakuliinis. Samuti esines mõlemas endomeetriumi rakuliinis ka MUC12, MUC13 ja MUC17 valke. Seega erinevatel mutsiinidel võivad olla endomeetriumi retseptiivsuse määramisel erinevad rollid. Katsed MUC1 *knock out* hiirtega on näitanud ainult mõningast emaste hiirte viljakuse vähenemist ning oletatakse, et teised endomeetriumis ekspresseeruvad mutsiinid võivad MUC1 puudumist kompenseerida (DeSouza jt, 1999; Spicer jt, 1995). Seega tasuks uurida ka teiste mutsiinide funktsioone inimese endomeetriumi erinevates tsükli faasides. Lisaks sellele võiks geeni vaigistamise katsete abil uurida, kas ühe mutsiini geeni puudumine avaldab mõju ka teiste mutsiinide geenide avaldumisele.

Käesoleva töös tulemustes ei esinenud korrelatsiooni MUC3 ja MUC15 valgu ning mRNA taseme vahel. Tihti ei ole transkriptsioon põhiliseks valgu taseme reguleerijaks. Rakus oleva valgu hulga määramisel on oluline roll translatsiooni efektiivsusel, mis võib sõltuda mRNA protsessingust, mittetransleerivatest järjestustest, sekundaarstruktuuridest, koodonkasutusest ning miRNAdest ja mRNAga seonduvatest regulatoorsetest valkudest. Samuti on valgu hulga määramisel oluline mRNA ning valgu stabiilsus. Paljudel transkriptsioonifaktoritel ning rakutsükli faase käivitavatel valkudel on nende taseme kiireks reguleerimiseks välja kujunenud ebastabiilne mRNA ning valgu struktuur (Schwanhauser jt, 2011; Vogel jt, 2010).

Käesolevas töös kasutati inimese trofoblastide ja endomeetriumi rakuliine. Paljud rakuliinid on saadud kasvajatelt ning neis on aastate jooksul tehtud passeerimiste käigus toimunud

mitmeid genoomseid ümberkorraldusi (Masters, 2000). Kuid primaarsete endomeetriumi, aga eriti trofoblastide rakkude kasvatamine koekultuuri tingimustes on seotud keeruliste tehniliste ja eetiliste probleemidega. Käesoleval ajal püütakse saada primaarsetele trofoblasti rakkudele sarnaseid rakke inimese embrüonaalsete tüvirakkude indutseeritud diferentseerumise kaudu, kuid saadud rakud ei vasta siiski täielikult normaalsetele trofoblastidele. Trofoblastide kultiveerimine platsentast eraldatud rakkudest on suhteliselt keeruline ning saadud rakkude hulk on väga piiratud (Golos jt, 2010). Lisaks vähendab rakuliinide kasutamine indiviidide vahelistest erinevustest tulenevaid muutujaid ning aitab vältida eetilisi probleeme, mis kaasneksid loommudelite kasutamisega (Masters, 2000). Antud töö kontekstis on olulised ka hiire ja inimese implantatsiooni ning platsenta arengu erinevused, mis raskendavad loomkatsete tulemuste seostamist inimeses toimuvaga. Näiteks MUC1 ekspressioon on retseptiivses hiire endomeetriumis märgatavalt langenud, seevastu inimese endomeetriumis hoopis tõusnud (Meseguer jt, 2001). Samuti on hiire ja inimese endomeetriumis hormonaalne mõju MUC1 ekspressioonile erinev (Brayman jt, 2006).

Käesoleva töö tulemused näitavad, et nii trofoblastidel kui ka endomeetriumi rakkudel ekspresseerub rohkem mutsiine kui siiani arvati. Lisaks selle selgus, et erisuguste mutsiinide ekspressiooni tase trofoblastide ja endomeetriumi rakkudes sõltub nende rakkude diferentseerumise tüübist. Kuivõrd mutsiinide rollist trofoblastide kinnitumisel endomeetriumi rakkudele ning nende edasise invasiooni reguleerimisel on vähe teada, siis väärrib see kindlasti täiendavat uurimist.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärkideks oli iseloomustada membraanseoseliste mutsiinide vastaseid uusi monoklonaalseid antikehasid ning uurida mutsiinide ekspressiooni erinevates inimese trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides.

Töö eesmärkidest lähtuvalt käsitleti kirjanduse ülevaates membraanseoselisi mutsiine ning üksikasjalikumalt käesolevas töös uuritud mutsiinide rolli raku molekulaarsete protsesside reguleerimisel. Samuti anti ülevaade inimese platsenta moodustumisest, endomeetriumi retseptiivsusest ja trofoblastide arengust. Lisaks toodi välja trofoblastide ja vähirakkude sarnasused.

Magistritöö eksperimentaalses osas iseloomustati kolme membraanseoselise mutsiini vastast uut monoklonaalset antikeha: 9G4, 10F8 ja 2E7, mis tunnevad ära vastavalt MUC4, MUC12 ja MUC17 valku. Selgus, et kõiki neid antikehasid saab kasutada mutsiinide tuvastamiseks immunoblot meetodil ning esimest neist ka immunofluorestsentsmikroskoopias. Mutsiinide ekspressiooni uuriti nii valgu kui ka mRNA tasemel kolmes trofoblasti rakuliinis (JAR, JEG-3, HTR8/SVneo), mis esindasid erinevaid trofoblasti tüüpe ning kahes endomeetriumi rakuliinis (RL95-2, HEC-1A), mis erinesid embrüotega seostumise poolest. Leiti, et mitme mutsiini puhul (MUC1, MUC3, MUC4, MUC13, MUC15) erinevad uuritud trofoblastide rakuliinid nii valgu kui ka mRNA ekspressiooni taseme poolest, mis lubab oletada, et tegelikult osaleb seni arvatust palju rohkem mutsiine trofoblastide diferentseerumise ja invasiooni reguleerimises. Samuti leiti, et mutsiinide (MUC1, MUC3, MUC15) ekspressiooni tase on erinev retseptiivse ja mitteretseptiivse endomeetriumi rakuliini vahel. Seetõttu võib arvata, et embrüo kinnitumise protsessis osalevad lisaks tedaolevatele veel mitmed teised mutsiinid.

Kuivõrd käesolevas magistritöös selgus, et uuritud mutsiinide ekspressiooni tase oli inimese trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides erinev, siis annab see aluse edasisteks uuringuteks normaalsete koe proovidega. Lisaks sellele on oluline tuvastada veel seni väheuuritud mutsiinide funktsioone seoses platsenta moodustumise ja arenguga.

SUMMARY

Study on mucin expression in human trophoblast and endometrial cell lines

Gerly Pöder

The development of the placenta begins at implantation when embryonic trophoblast cells come into contact with maternal endometrial cells. Implantation can only occur during the window of receptivity when the endometrium has differentiated into the decidua which is able to support the fetus during the course of the pregnancy. After the initial contact, the trophoblast cells invade into the maternal decidua in order to remodel the uterine vascular network. During the formation of the placenta the trophoblast cells differentiate into many different subsets of trophoblast cells that have similar characteristics with cancer cells. Aberrant implantation and placental formation can lead to fatal outcomes for both the mother and the fetus. The study of early human development is limited by ethical restrictions and therefore different model systems have to be used.

Mucins are highly glycosylated proteins that are mainly expressed on the surface of epithelial cells. Mucin expression and glycosylation pattern is altered in several pathologies including infertility and cancer. They are involved in different signalling pathways promoting cancer cell proliferation, survival and immune evasion. MUC1 and MUC15 expression has been studied during human placental development but little is known about the expression of other membrane-bound mucins in different types of placental cells. MUC1 could be the first protein that the human embryo encounters during the apposition phase of implantation and it is cleaved from the endometrial cell surface during the attachment phase. Studies with the MUC1 knockout mouse have shown only a marginal reduction in fertility and it is believed that other mucins could compensate for the lack of MUC1 in the reproductive tract.

The aim of this study was to characterise new monoclonal antibodies against transmembrane mucins and evaluate the expression pattern of mucins on the mRNA and protein level in three different human trophoblast cell lines (JAR, JEG-2 and HTR8/SVneo) and two different human endometrial cell lines (RL95-2 and HEC-1A). Mucin antibody specificity was analysed with Western blot and immunofluorescence microscopy. Mucin protein expression in trophoblast and endometrial cell lines was analysed using the Western blot method and mRNA levels were quantified using qPCR.

New monoclonal antibodies against MUC4, MUC12 and MUC17 were characterised. They showed reactivity with mucin expressing cell lines and did not react with mucin negative cell lines. The expression of seven mucins (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, and MUC17) was seen on both human trophoblast and endometrial cell lines. What is more, MUC1, MUC3, MUC4, MUC13 and MUC15 expression was differential in trophoblast cell lines; and MUC1, MUC3 and MUC15 showed differential expression in endometrial cell lines.

In conclusion, human trophoblast and endometrial cells could express more mucin genes than previously thought. Furthermore, their expression pattern changes during cell differentiation. The function of different mucins during human placental development remains to be elucidated.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajaid Erkki Juroneni ja Sulev Ingerpuud heade nõuannete ja põhjaliku juhendamise eest.

KIRJANDUSE LOETELU

- Achache H. ja Revel A. (2006) Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 12: 731-746.
- Andrianifahanana M., Moniaux N. ja Batra S. K. (2006) Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta* 1765: 189-222.
- Bojic-Trbojevic Z., Jovanovic Krivokuca M., Kolundzic N., Petronijevic M., Vrzic-Petronijevic S., Golubovic S. ja Vicovac L. (2014) Galectin-1 binds mucin in human trophoblast. *Histochem Cell Biol* 142: 541-553.
- Brayman M., Thathiah A. ja Carson D. D. (2004) MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 4.
- Brayman M. J., Julian J., Mulac-Jericevic B., Conneely O. M., Edwards D. P. ja Carson D. D. (2006) Progesterone receptor isoforms A and B differentially regulate MUC1 expression in uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* 20: 2278-2291.
- Brosens J. J., Salker M. S., Teklenburg G., Nautiyal J., Salter S., Lucas E. S., Steel J. H., Christian M., Chan Y. W., Boomsma C. M., Moore J. D., Hartshorne G. M., Sucurovic S., Mulac-Jericevic B., Heijnen C. J., Quenby S., Koerkamp M. J., Holstege F. C., Shmygol A. ja Macklon N. S. (2014) Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci Rep* 4: 3894.
- Burton G. J. ja Fowden A. L. (2015) The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370: 20140066.
- Chang C. Y., Chang H. W., Chen C. M., Lin C. Y., Chen C. P., Lai C. H., Lin W. Y., Liu H. P., Sheu J. J. ja Tsai F. J. (2011) MUC4 gene polymorphisms associate with endometriosis development and endometriosis-related infertility. *BMC Med* 9: 19.
- Chaturvedi P., Singh A. P., Moniaux N., Senapati S., Chakraborty S., Meza J. L. ja Batra S. K. (2007) MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins. *Mol Cancer Res* 5: 309-320.
- Chaturvedi P., Singh A. P. ja Batra S. K. (2008a) Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *FASEB J* 22: 966-981.
- Chaturvedi P., Singh A. P., Chakraborty S., Chauhan S. C., Bafna S., Meza J. L., Singh P. K., Hollingsworth M. A., Mehta P. P. ja Batra S. K. (2008b) MUC4 mucin interacts with

- and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 68: 2065-2070.
- Chauhan S. C., Vannatta K., Ebeling M. C., Vinayek N., Watanabe A., Pandey K. K., Bell M. C., Koch M. D., Aburatani H., Lio Y. ja Jaggi M. (2009) Expression and functions of transmembrane mucin MUC13 in ovarian cancer. *Cancer Res* 69: 765-774.
- Chauhan S. C., Ebeling M. C., Maher D. M., Koch M. D., Watanabe A., Aburatani H., Lio Y. ja Jaggi M. (2012) MUC13 mucin augments pancreatic tumorigenesis. *Mol Cancer Ther* 11: 24-33.
- Chervenak J. L. ja Illsley N. P. (2000) Episialin acts as an antiadhesive factor in an in vitro model of human endometrial-blastocyst attachment. *Biol Reprod* 63: 294-300.
- Corfield A. P. (2015) Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochim Biophys Acta* 1850: 236-252.
- Crawley S. C., Gum J. R., Jr., Hicks J. W., Pratt W. S., Aubert J. P., Swallow D. M. ja Kim Y. S. (1999) Genomic organization and structure of the 3' region of human MUC3: alternative splicing predicts membrane-bound and soluble forms of the mucin. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 728-736.
- de Bolos C., Guma M., Barranco C., Garrido M., Kim Y. S. ja Real F. X. (1998) MUC6 expression in breast tissues and cultured cells: abnormal expression in tumors and regulation by steroid hormones. *Int J Cancer* 77: 193-199.
- DeSouza M. M., Surveyor G. A., Price R. E., Julian J., Kardon R., Zhou X., Gendler S., Hilkens J. ja Carson D. D. (1999) MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol* 45: 127-158.
- Dharmaraj N., Chapela P. J., Morgado M., Hawkins S. M., Lessey B. A., Young S. L. ja Carson D. D. (2014) Expression of the transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16, in normal endometrium and in endometriosis. *Hum Reprod* 29: 1730-1738.
- Diedrich K., Fauser B. C., Devroey P. ja Griesinger G. (2007) The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update* 13: 365-377.
- Dunwoodie S. L. (2009) The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell* 17: 755-773.
- Duraisamy S., Ramasamy S., Kharbanda S. ja Kufe D. (2006) Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 AND MUC16. *Gene* 373: 28-34.

- Ferretti C., Bruni L., Dangles-Marie V., Pecking A. P. ja Bellet D. (2007) Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Hum Reprod Update* 13: 121-141.
- Fritz R., Jain C. ja Armant D. R. (2014) Cell signaling in trophoblast-uterine communication. *Int J Dev Biol* 58: 261-271.
- Gendler S. J. (2001) MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6: 339-353.
- Geng Y., Yeh K., Takatani T. ja King M. R. (2012) Three to Tango: MUC1 as a Ligand for Both E-Selectin and ICAM-1 in the Breast Cancer Metastatic Cascade. *Front Oncol* 2: 76.
- Golos T. G., Giakoumopoulos M. ja Garthwaite M. A. (2010) Embryonic stem cells as models of trophoblast differentiation: progress, opportunities, and limitations. *Reproduction* 140: 3-9.
- Gum J. R., Jr., Crawley S. C., Hicks J. W., Szymkowski D. E. ja Kim Y. S. (2002) MUC17, a novel membrane-tethered mucin. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 466-475.
- Gupta B. K., Maher D. M., Ebeling M. C., Stephenson P. D., Puumala S. E., Koch M. R., Aburatani H., Jaggi M. ja Chauhan S. C. (2014) Functions and regulation of MUC13 mucin in colon cancer cells. *J Gastroenterol* 49: 1378-1391.
- Hannan N. J., Paiva P., Dimitriadis E. ja Salamonsen L. A. (2010) Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod* 82: 235-245.
- Horne A. W., White J. O., Margara R. A., Williams R., Winston R. M. ja Lalani E. (2001) MUC 1: a genetic susceptibility to infertility? *Lancet* 357: 1336-1337.
- Horne A. W., Lalani E. N., Margara R. A., Ryder T. A., Mobberley M. A. ja White J. O. (2005) The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women. *Mol Reprod Dev* 72: 216-229.
- Huang J., Che M. I., Huang Y. T., Shyu M. K., Huang Y. M., Wu Y. M., Lin W. C., Huang P. H., Liang J. T., Lee P. H. ja Huang M. C. (2009) Overexpression of MUC15 activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 and promotes the oncogenic potential of human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 30: 1452-1458.
- Huppertz B., Berghold V. M., Kawaguchi R. ja Gauster M. (2012) A variety of opportunities for immune interactions during trophoblast development and invasion. *Am J Reprod Immunol* 67: 349-357.

- Hussar P., Hussar Ü., Kärner J. ja Suuroja T. (2005) Histoloogia (Miniloengud. Praktikumid), Tartu: OÜ Halo Kirjastus.
- James J. L., Carter A. M. ja Chamley L. W. (2012) Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? *Placenta* 33: 327-334.
- Jeschke U., Richter D. U., Hammer A., Briese V., Friese K. ja Karsten U. (2002) Expression of the Thomsen-Friedenreich antigen and of its putative carrier protein mucin 1 in the human placenta and in trophoblast cells in vitro. *Histochem Cell Biol* 117: 219-226.
- Jeschke U., Walzel H., Mylonas I., Papadopoulos P., Shabani N., Kuhn C., Schulze S., Friese K., Karsten U., Anz D. ja Kupka M. S. (2009) The human endometrium expresses the glycoprotein mucin-1 and shows positive correlation for Thomsen-Friedenreich epitope expression and galectin-1 binding. *J Histochem Cytochem* 57: 871-881.
- Jonckheere N., Skrypek N., Merlin J., Dessein A. F., Dumont P., Leteurtre E., Harris A., Desseyn J. L., Susini C., Frenois F. ja Van Seuning I. (2012) The mucin MUC4 and its membrane partner ErbB2 regulate biological properties of human CAPAN-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways. *PLoS One* 7: e32232.
- Jonckheere N., Skrypek N., Frenois F. ja Van Seuning I. (2013) Membrane-bound mucin modular domains: from structure to function. *Biochimie* 95: 1077-1086.
- Kitamoto S., Yokoyama S., Higashi M., Yamada N., Matsubara S., Takao S., Batra S. K. ja Yonezawa S. (2012) Expression of MUC17 is regulated by HIF1 α -mediated hypoxic responses and requires a methylation-free hypoxia responsible element in pancreatic cancer. *PLoS One* 7: e44108.
- Knofler M. ja Pollheimer J. (2013) Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Front Genet* 4: 190.
- Kumar P., Ji J., Thirkill T. L. ja Douglas G. C. (2014) MUC1 Is Expressed by Human Skin Fibroblasts and Plays a Role in Cell Adhesion and Migration. *Biores Open Access* 3: 45-52.
- Kumpel B. M. ja Manoussaka M. S. (2012) Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox Sang* 102: 2-12.
- Lang T., Hansson G. C. ja Samuelsson T. (2007) Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16209-16214.

- Leroy X., Copin M. C., Devisme L., Buisine M. P., Aubert J. P., Gosselin B. ja Porchet N. (2002) Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology* 40: 450-457.
- Li W., Wu C., Yao Y., Dong B., Wei Z., Lv X., Zhang J. ja Xu Y. (2014) MUC4 modulates human glioblastoma cell proliferation and invasion by upregulating EGFR expression. *Neurosci Lett* 566: 82-87.
- Livak K. J. ja Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Louis N. A., Hamilton K. E., Canny G., Shekels L. L., Ho S. B. ja Colgan S. P. (2006) Selective induction of mucin-3 by hypoxia in intestinal epithelia. *J Cell Biochem* 99: 1616-1627.
- Luu Y., Junker W., Rachagani S., Das S., Batra S. K., Heinrikson R. L., Shekels L. L. ja Ho S. B. (2010) Human intestinal MUC17 mucin augments intestinal cell restitution and enhances healing of experimental colitis. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 996-1006.
- Marx V. (2013) Finding the right antibody for the job. *Nat. Methods* 10: 703-707.
- Masters J. R. (2000) Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 233-236.
- Matsuyama T., Ishikawa T., Mogushi K., Yoshida T., Iida S., Uetake H., Mizushima H., Tanaka H. ja Sugihara K. (2010) MUC12 mRNA expression is an independent marker of prognosis in stage II and stage III colorectal cancer. *Int J Cancer* 127: 2292-2299.
- Meseguer M., Aplin J. D., Caballero-Campo P., O'Connor J. E., Martin J. C., Remohi J., Pellicer A. ja Simon C. (2001) Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod* 64: 590-601.
- Moffett A. ja Loke C. (2006) Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* 6: 584-594.
- Moniaux N., Junker W. M., Singh A. P., Jones A. M. ja Batra S. K. (2006) Characterization of human mucin MUC17. Complete coding sequence and organization. *J Biol Chem* 281: 23676-23685.
- Mukhopadhyay P., Lakshmanan I., Ponnusamy M. P., Chakraborty S., Jain M., Pai P., Smith L. M., Lele S. M. ja Batra S. K. (2013) MUC4 overexpression augments cell migration and metastasis through EGFR family proteins in triple negative breast cancer cells. *PLoS One* 8: e54455.

- Murphy C. R. (2004) Uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Cell Res* 14: 259-267.
- Nath S. ja Mukherjee P. (2014) MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* 20: 332-342.
- Pallesen L. T., Berglund L., Rasmussen L. K., Petersen T. E. ja Rasmussen J. T. (2002) Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin. *Eur J Biochem* 269: 2755-2763.
- Pallesen L. T., Pedersen L. R., Petersen T. E., Knudsen C. R. ja Rasmussen J. T. (2008) Characterization of human mucin (MUC15) and identification of ovine and caprine orthologs. *J Dairy Sci* 91: 4477-4483.
- Ponnusamy M. P., Singh A. P., Jain M., Chakraborty S., Moniaux N. ja Batra S. K. (2008) MUC4 activates HER2 signalling and enhances the motility of human ovarian cancer cells. *Br J Cancer* 99: 520-526.
- Pratt W. S., Crawley S., Hicks J., Ho J., Nash M., Kim Y. S., Gum J. R. ja Swallow D. M. (2000) Multiple transcripts of MUC3: evidence for two genes, MUC3A and MUC3B. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 916-923.
- Rachagani S., Macha M. A., Ponnusamy M. P., Haridas D., Kaur S., Jain M. ja Batra S. K. (2012) MUC4 potentiates invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through stabilization of fibroblast growth factor receptor 1. *Carcinogenesis* 33: 1953-1964.
- Schwanhausser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W. ja Selbach M. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473: 337-342.
- Senapati S., Ho S. B., Sharma P., Das S., Chakraborty S., Kaur S., Niehans G. ja Batra S. K. (2010) Expression of intestinal MUC17 membrane-bound mucin in inflammatory and neoplastic diseases of the colon. *J Clin Pathol* 63: 702-707.
- Senapati S., Chaturvedi P., Chaney W. G., Chakraborty S., Gnanapragassam V. S., Sasson A. R. ja Batra S. K. (2011) Novel INTERaction of MUC4 and galectin: potential pathobiological implications for metastasis in lethal pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 17: 267-274.
- Senapati S., Gnanapragassam V. S., Moniaux N., Momi N. ja Batra S. K. (2012) Role of MUC4-NIDO domain in the MUC4-mediated metastasis of pancreatic cancer cells. *Oncogene* 31: 3346-3356.

- Shen F., Yan C., Liu M., Feng Y. ja Chen Y. (2015) Decreased expression of mucin-1 in endometriosis endometrium correlated with progesterone receptor B involved in infertility. *Arch Gynecol Obstet* 291: 439-445.
- Shyu M. K., Lin M. C., Shih J. C., Lee C. N., Huang J., Liao C. H., Huang I. F., Chen H. Y., Huang M. C. ja Hsieh F. J. (2007) Mucin 15 is expressed in human placenta and suppresses invasion of trophoblast-like cells in vitro. *Hum Reprod* 22: 2723-2732.
- Shyu M. K., Lin M. C., Liu C. H., Fu Y. R., Shih J. C., Lee C. N., Chen H. Y., Huang J., Huang M. C. ja Hsieh F. J. (2008) MUC1 expression is increased during human placental development and suppresses trophoblast-like cell invasion in vitro. *Biol Reprod* 79: 233-239.
- Shyu M. K., Chen C. W., Lin N. Y., Liao W. C., Chen C. H., Lin C. J., Huang H. C., Lee J. J., Huang M. J., Tseng G. F., Shih J. C., Lee C. N., Hsieh F. J. ja Huang M. C. (2011) MUC1 expression is elevated in severe preeclamptic placentas and suppresses trophoblast cell invasion via beta1-integrin signaling. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 3759-3767.
- Singh A. P., Moniaux N., Chauhan S. C., Meza J. L. ja Batra S. K. (2004) Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res* 64: 622-630.
- Spicer A. P., Rowse G. J., Lidner T. K. ja Gendler S. J. (1995) Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice. *J Biol Chem* 270: 30093-30101.
- Zhi X., Tao J., Xie K., Zhu Y., Li Z., Tang J., Wang W., Xu H., Zhang J. ja Xu Z. (2014) MUC4-induced nuclear translocation of beta-catenin: a novel mechanism for growth, metastasis and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Lett* 346: 104-113.
- Teklenburg G., Salker M., Molokhia M., Lavery S., Trew G., Aojanepong T., Mardon H. J., Lokugamage A. U., Rai R., Landles C., Roelen B. A., Quenby S., Kuijk E. W., Kavelaars A., Heijnen C. J., Regan L., Brosens J. J. ja Macklon N. S. (2010) Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation. *PLoS One* 5: e10258.
- Thathiah A., Blobel C. P. ja Carson D. D. (2003) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding. *J Biol Chem* 278: 3386-3394.
- Thathiah A., Brayman M., Dharmaraj N., Julian J. J., Lagow E. L. ja Carson D. D. (2004) Tumor necrosis factor alpha stimulates MUC1 synthesis and ectodomain release in a human uterine epithelial cell line. *Endocrinology* 145: 4192-4203.

- Thathiah A. ja Carson D. D. (2004) MT1-MMP mediates MUC1 shedding independent of TACE/ADAM17. *Biochem J* 382: 363-373.
- Thirkill T. L., Cao T., Stout M., Blankenship T. N., Barakat A. ja Douglas G. C. (2007) MUC1 is involved in trophoblast transendothelial migration. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1007-1014.
- Uchida H., Maruyama T., Nishikawa-Uchida S., Oda H., Miyazaki K., Yamasaki A. ja Yoshimura Y. (2012) Studies using an in vitro model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation. *J Biol Chem* 287: 4441-4450.
- Walsh M. D., Young J. P., Leggett B. A., Williams S. H., Jass J. R. ja McGuckin M. A. (2007) The MUC13 cell surface mucin is highly expressed by human colorectal carcinomas. *Hum Pathol* 38: 883-892.
- Wang R. Q. ja Fang D. C. (2003) Alterations of MUC1 and MUC3 expression in gastric carcinoma: relevance to patient clinicopathological features. *J Clin Pathol* 56: 378-384.
- Wang R. Y., Chen L., Chen H. Y., Hu L., Li L., Sun H. Y., Jiang F., Zhao J., Liu G. M., Tang J., Chen C. Y., Yang Y. C., Chang Y. X., Liu H., Zhang J., Yang Y., Huang G., Shen F., Wu M. C., Zhou W. P. ja Wang H. Y. (2013) MUC15 inhibits dimerization of EGFR and PI3K-AKT signaling and is associated with aggressive hepatocellular carcinomas in patients. *Gastroenterology* 145: 1436-1448 e1431-1412.
- Weber M., Knoefler I., Schleussner E., Markert U. R. ja Fitzgerald J. S. (2013) HTR8/SVneo cells display trophoblast progenitor cell-like characteristics indicative of self-renewal, repopulation activity, and expression of "stemness-" associated transcription factors. *Biomed Res Int* 2013: 243649.
- Williams S. J., McGuckin M. A., Gotley D. C., Eyre H. J., Sutherland G. R. ja Antalis T. M. (1999a) Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. *Cancer Res* 59: 4083-4089.
- Williams S. J., Munster D. J., Quin R. J., Gotley D. C. ja McGuckin M. A. (1999b) The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 83-89.
- Williams S. J., Wreschner D. H., Tran M., Eyre H. J., Sutherland G. R. ja McGuckin M. A. (2001) Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem* 276: 18327-18336.

- Vogel C., Abreu Rde S., Ko D., Le S. Y., Shapiro B. A., Burns S. C., Sandhu D., Boutz D. R., Marcotte E. M. ja Penalva L. O. (2010) Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Mol Syst Biol* 6: 400.
- Xu B., Sun X., Li L., Wu L., Zhang A. ja Feng Y. (2012) Pinopodes, leukemia inhibitory factor, integrin-beta3, and mucin-1 expression in the peri-implantation endometrium of women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 98: 389-395.
- Yu L. G., Andrews N., Zhao Q., McKean D., Williams J. F., Connor L. J., Gerasimenko O. V., Hilkens J., Hirabayashi J., Kasai K. ja Rhodes J. M. (2007) Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion. *J Biol Chem* 282: 773-781.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Placenta_-_Villi_Development

LISAD

Lisa 1.

Western blotis ja immunofluorestsentsmikroskoopias kasutatud antikehad

Antikeha	Firma/autor, riik	Algkontsentratsioon	Lahjendus
Primaarsed antikehad			
Inimese MUC1 vastane k��liku MAK	Epitomics, USA		1:1000
Inimese MUC3 vastane k��liku PAK	Sigma Aldrich, USA	1 mg/ml	1:1000
Inimese MUC4 vastane hiire MAK	Erkki Juronen, Eesti	1 mg/ml	1:1000
Inimese MUC4 vastane k��liku PAK	Novus biologicals, USA	0,56 mg/ml	1:2000
Inimese MUC12 vastane hiire MAK	Erkki Juronen, Eesti	1,8 mg/ml	1:1800
Inimese MUC13 vastane k��liku PAK	Thermo Fisher Scientific, USA	0,25 mg/ml	1:1000
Inimese MUC15 vastane k��liku PAK	Novus Biologicals, USA	1 mg/ml	1:500
Inimese MUC17 vastane hiire MAK	Erkki Juronen, Eesti	H��bridoomilt eraldatud s��de	
Inimese aktiini vastane k��liku PAK	Santa Cruz Biotechnology, USA	200 �g/ml	1:5000
Sekundaarsed antikehad			
HRP-ga seotud hiire immunoglobuliinide vastane kitse PAK	Erkki Juronen, Eesti		1:1000
HRP-ga seotud k��liku immunoglobuliinide vastane kitse PAK	Erkki Juronen, Eesti		1:1000
HRP-ga seotud hiire immunoglobuliinide vastane kitse PAK	Santa Cruz Biotechnology, USA	400 �g/ml	1:5000
HRP-ga seotud k��liku immunoglobuliinide vastane kitse PAK	Santa Cruz Biotechnology, USA	400 �g/ml	1:5000
Alexa Fluor 488-ga seotud hiire immunoglobuliinide vastane kitse PAK	Thermo Fisher Scientific, USA		1:500
Alexa Fluor 594-ga seotud hiire immunoglobuliinide vastane kana PAK	Thermo Fisher Scientific, USA		1:500

Lisa 2.

Kokkuvõttev tabel mutsiinide valgu ja mRNA tasemete võrdlemiseks trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides. Võrreldakse konkreetse mutsiini suhtelist ekspressioonitaset valgu või mRNA tasemel kolme trofoblasti rakuliini vahel või kahe endomeetriumi rakuliini vahel. „+” tähistab valgu/mRNA esinemist ja „-” mitteesinemist. Punasega on märgitud ebakõlad valgu ja mRNA taseme vahel.

Mutsiin/rakuliin	Suhteline ekspressioon trofoblasti rakuliinides (valk/mRNA)			Suhteline ekspressioon endomeetriumi rakuliinides (valk/mRNA)	
	JAR	JEG-3	HTR8/SVneo	RL95-2	HEC-1A
MUC1	+/+++	-/+	-/++	+/+	++/++
MUC3	+/+++	-/++	+/+	+/++	+/+
MUC4	++	++	+	+	+
MUC12	+	+	+	+	+
MUC13	++	++	+	+	+
MUC15	+/+	-/++	-/-	++/+	+/-
MUC17	+	+	+	+	+

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Gerly Pöder

(sünnikuupäev: 10. juuli 1991. a)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Mutsiinide ekspressiooni uurimine inimese trofoblasti- ja endomeetriumi rakuliinides,

mille juhendajad on Erkki Juronen ja Sulev Ingerpuu,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2018.** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, (26.05.2015.)